

Erzeugung von Histondeazetylase-Hemmer-resistenten Tumorzellen durch mehrfache Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen von Trichostatin A

Abstract

Histondeazetylasen-Hemmer gelten als viel versprechende Chemotherapeutika in der Krebsbekämpfung, und einige davon werden bereits in den Kliniken eingesetzt. Kürzlich wurde gezeigt, dass sowohl das Depsipeptid FK228 wie auch das Hydroxamsäurederivat SAHA eine Resistenz bei Tumorzellen verursachen kann, was darauf hindeutet, dass möglicherweise Histondeazetylasen-Hemmer neben ihrer nachweislich chemotherapeutischen Wirkung auch das Potenzial haben, Resistenzen zu verursachen. Die hier vorliegende Arbeit bestätigt diesen Sachverhalt. Sie zeigt nämlich, dass durch mehrfache Behandlung von Tumorzellen mit ansteigenden Konzentrationen von Trichostatin A (TSA) eine Resistenz gegenüber TSA erzeugt werden kann. Darüber hinaus sind diese TSA-induzierten, resistenten Zellen auch so genannt kreuz-resistent gegenüber SAHA und Valproinsäure (VPA). Im Gegensatz zur vorher beschriebenen FK228-induzierten Resistenz ist die TSA-induzierte Resistenz - wie auch die SAHA-induzierte Resistenz - nicht reversibel und scheint nicht mit der Expression der „Multidrug Resistance“-Effluxpumpe (MDR1) zu korrelieren. Diese Resultate könnten auf einen möglicherweise neuen, noch nicht beschriebenen Mechanismus der Resistenzentwicklung hindeuten, der sich von demjenigen bedingt durch FK228 unterscheidet. Ein zweiter interessanter Aspekt, der aus dieser Arbeit hervorgeht, betrifft das DNA Mismatch Repair (MMR)-Protein MLH1. Seine Anwesenheit in der Zelle scheint nämlich die Resistenzentwicklung durch TSA zu verhindern, dies im Gegensatz zur Resistenzentwicklung durch SAHA. Dies könnte auf eine neue, möglicherweise MMR-unabhängige Funktion von MLH1 hindeuten. Diese neueren in vitro Erkenntnisse könnten - sollten sie sich in vivo Studien bestätigen - klinische Bedeutung erlangen bezüglich des Einsatzes von Histondeazetylasen-Hemmern im Kampf gegen Krebserkrankungen.

Universitätsspital Zürich
Departement für Frauenheilkunde
Vorsitzender: Prof. Dr. med. R. Zimmermann
Klinik für Gynäkologie
Direktor: Prof. Dr. med. D. Fink

Arbeit unter Leitung von Dr. phil. II A. Fedier

**Erzeugung von Histondeazetylase-Hemmer-resistenten Tumorzellen durch
mehrfache Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen von Trichostatin A**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

Michèle Akane Furlato

von Italien

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. D. Fink

Zürich 2009

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	3
2 Einleitung	4
2.1 Chromatinstruktur	4
2.2 Posttranslationale Modifizierung von Chromatin	5
2.3 Azetylierung und Deazetylierung von Histonen	5
2.4 Histondeazetylasen	6
2.5 Der epigenetische Code	9
2.6 Histondeazetylasen-Hemmer	10
2.6.1 Trichostatin A	12
2.6.2 Suberoylanilid-Hydroxamsäure	13
2.6.3 Valproinsäure	14
2.7 Chemoresistenz	15
2.7.1 Chemoresistenz durch defekte DNA Mismatch Reparatur	15
2.7.2 Chemoresistenz bei Histondeazetylasen-Hemmern	17
2.8 Zielsetzung der Arbeit	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Zellkulturmedien, -reagenzien und -materialien	19
3.1.2 Zelllinien	19
3.1.3 Histondeazetylasen-Hemmer	19
3.2 Methoden	20
3.2.1 Zellkulturen	20
3.2.2 Erzeugung von mehrfach TSA-vorbehandelten Varianten	20
3.2.3 Clonogenic Assay und Giemsa-Färbung	22
3.2.4 Auswertung und Statistik	22

4 Resultate	24
4.1 Herstellung der TSA-vorbehandelten Subzelllinien	24
4.2 Sensitivität gegenüber TSA	25
4.3 Sensitivität gegenüber SAHA	27
4.4 Sensitivität gegenüber VPA	28
4.5 Stabilität der Resistenz	30
5 Diskussion	31
5.1 Histondeazetylasen-Hemmer als potente Chemotherapeutika und potenzielle Verursacher von Resistenz	31
5.2 Histondeazetylasen-Hemmer-induzierte Resistenz: die möglichen Ursachen und die Rolle von MLH1	32
5.3 Resistenz durch FK228 versus SAHA und TSA: ein Vergleich	33
5.4 Bedeutung der Resultate und Ausblick	34
6 Literaturverzeichnis	35
7 Danksagung	42
8 Curriculum Vitae	43

1 Zusammenfassung

Histondeazetylasen-Hemmer gelten als viel versprechende Chemotherapeutika in der Krebsbekämpfung, und einige davon werden bereits in den Kliniken eingesetzt. Kürzlich wurde gezeigt, dass sowohl das Depsipeptid FK228 wie auch das Hydroxamsäurederivat SAHA eine Resistenz bei Tumorzellen verursachen kann, was darauf hindeutet, dass möglicherweise Histondeazetylasen-Hemmer neben ihrer nachweislich chemotherapeutischen Wirkung auch das Potenzial haben, Resistenzen zu verursachen. Die hier vorliegende Arbeit bestätigt diesen Sachverhalt. Sie zeigt nämlich, dass durch mehrfache Behandlung von Tumorzellen mit ansteigenden Konzentrationen von Trichostatin A (TSA) eine Resistenz gegenüber TSA erzeugt werden kann. Darüber hinaus sind diese TSA-induzierten, resistenten Zellen auch so genannt kreuz-resistent gegenüber SAHA und Valproinsäure (VPA). Im Gegensatz zur vorher beschriebenen FK228-induzierten Resistenz ist die TSA-induzierte Resistenz - wie auch die SAHA-induzierte Resistenz - nicht reversibel und scheint nicht mit der Expression der „Multidrug Resistance“-Effluxpumpe (MDR1) zu korrelieren. Diese Resultate könnten auf einen möglicherweise neuen, noch nicht beschriebenen Mechanismus der Resistenzentwicklung hindeuten, der sich von demjenigen bedingt durch FK228 unterscheidet. Ein zweiter interessanter Aspekt, der aus dieser Arbeit hervorgeht, betrifft das DNA Mismatch Repair (MMR)-Protein MLH1. Seine Anwesenheit in der Zelle scheint nämlich die Resistenzentwicklung durch TSA zu verhindern, dies im Gegensatz zur Resistenzentwicklung durch SAHA. Dies könnte auf eine neue, möglicherweise MMR-unabhängige Funktion von MLH1 hindeuten. Diese neueren *in vitro* Erkenntnisse könnten – sollten sie sich *in vivo* Studien bestätigen – klinische Bedeutung erlangen bezüglich des Einsatzes von Histondeazetylasen-Hemmern im Kampf gegen Krebserkrankungen.

2 Einleitung

2.1 Chromatinstruktur

Die DNA (=Deoxyribonucleic acid) liegt im Zellkern (Nukleus) von eukaryontischen Zellen in Form von Chromatin vor. Die Grundeinheit des Chromatins bildet das Nukleosom. Ein einzelnes Nukleosom besteht aus einem Komplex aus acht Histonproteinen – je zwei Moleküle der Histone H2A, H2B, H3 und H4 – und einem doppelsträngigen DNA-Molekül von ungefähr 146 Nukleotidpaaren, das als linksgängige Superhelix in $1\frac{3}{4}$ Windungen um das Histonoktamer gewickelt ist (Li, 1975; Luger et al., 1997). Histone sind aufgrund ihrer zahlreichen ϵ -aminoterminalen Lysinreste basische Proteine. Dabei haftet die negativ geladene DNA infolge der elektrostatischen Wechselwirkungen an den positiv geladenen Histonproteinen. Die ϵ -aminoterminalen Lysinreste der Histone treten im Nukleosom nach aussen hervor und sind so für verschiedenste Modifikationen wie Azetylierung, Methylierung und Phosphorylierung gut zugänglich (Jenuwein und Allis, 2001) (**Abb. 1**). Die einzelnen Nukleosom-Kernpartikel sind über Linker-DNA „perlschnurartig“ verbunden, deren Länge bis zu 80 Nukleotidpaaren betragen kann. An die Linker-DNA binden Histone vom H1-Typ, die an der Kompaktierung des Chromatins zu Strukturen höherer Ordnung beteiligt sind. Es wird zwischen Euchromatin (locker gepackt, hohe Genaktivität) und Heterochromatin (fest gepackt, fast keine Genaktivität) unterschieden. Während der Mitose und Meiose verwandelt sich das fadige Material des Chromatins in noch kompaktere Strukturen, die Chromosomen.

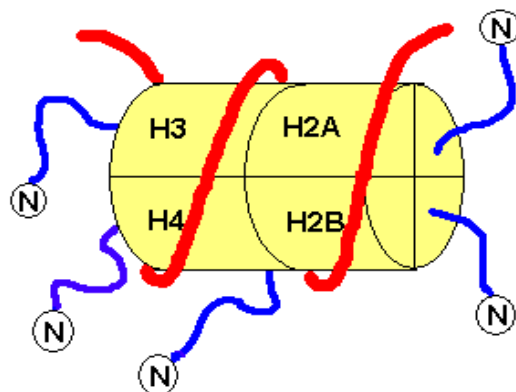


Abb. 1: Darstellung eines Nukleosoms, welches ein Histonoktamer (gelb) enthält, um welches sich die DNA (rot) wickelt. Aus dem Histonoktamer treten ϵ -aminoterminalen Lysinreste (blau) hervor.

2.2 Posttranslationale Modifizierung von Chromatin

Durch die posttranslationale Modifizierung der ϵ -aminoterminalen Lysinreste der Histone durch Azetylierung, Methylierung und Phosphorylierung wird die transkriptionale Aktivität erhöht (Jenuwein und Allis, 2001). Die bei weitem häufigste posttranslationale Modifizierung ist die reversible Azetylierung der Histone. Es ist seit den 70er-Jahren bekannt, dass die Histone azetyliert werden können (Allfrey et al., 1964; Pogo et al., 1966), doch wie dieses Gleichgewicht der Azetylierung aufrechterhalten wird, wurde erst viel später, in den 90er-Jahren, durch die Entdeckung der dafür verantwortlichen Enzyme erklärbar. Durch die Charakterisierung der beteiligten enzymatischen Aktivitäten konnten direkte kausale Zusammenhänge zwischen der Azetylierung einzelner Aminosäuren der Histone und entsprechenden molekularen Mechanismen in der Zelle hergestellt werden (Turner, 2000). Die Azetylierung beeinflusst die Ladung und Funktion der Histone, und dadurch wird auch die Verfügbarkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren verändert (Grunstein, 1997). Durch die Azetylierung werden dabei auch diverse Non-Histonproteine, z.B. Transkriptionsfaktoren und Mediatoren für bestimmte Signaltransduktionen, modifiziert (Drummond et al., 2005). Die Histonen modifizierenden Enzyme ermöglichen somit allen Proteinen, die an der Genexpression, Replikation und Reparatur mitwirken, schnellen und effektiven Zugang zu den dafür nötigen DNA-Sequenzen (**Abb. 2**).

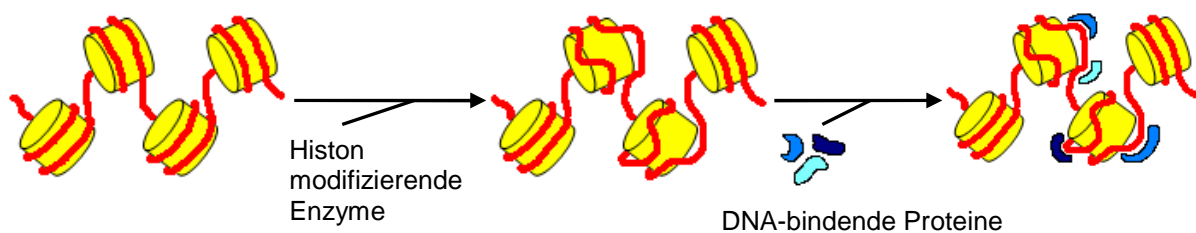


Abb. 2: Schematische Darstellung der Veränderung der Nukleosomenstruktur durch Histonmodifizierende Enzyme. Durch die Enzyme wird die DNA um die Histone aufgelockert, und dadurch wird für Proteine der Zugang zur DNA erleichtert.

2.3 Azetylierung und Deazetylierung von Histonen

Der Azetylierungsstatus von Histonen wird durch zwei Enzymgruppen reguliert. Die eine Enzymgruppe, genannt Histonazetyltransferasen (HATs), ersetzen positiv geladene

Aminogruppen der Histone durch ladungsneutrale Azetylreste. Dabei wird die Azetylgruppe von Azetyl-Coenzym A auf die ϵ -Aminogruppe der Lysine übertragen. Die positive Ladung wird neutralisiert und die Affinität der Histone zur DNA vermindert. Somit ist die DNA frei für Proteine und Transkriptionsfaktoren. Dadurch können Gene aktiviert werden, die die Differenzierung und die Apoptose von Zellen regulieren, wobei dies eine entscheidende Rolle für die Eliminierung von Tumorzellen spielt.

Die andere Enzymgruppe bewirkt die gegenläufige Reaktion. Sie bewirkt die Hydrolyse der Amidbindung. Dabei wird als Reaktionsprodukt Azetat frei. Diese Enzyme heissen ihrer Funktion nach Histondeazetylasen (HDACs). Diese beiden Reaktionen sind unten schematisch gezeigt (**Abb. 3**).

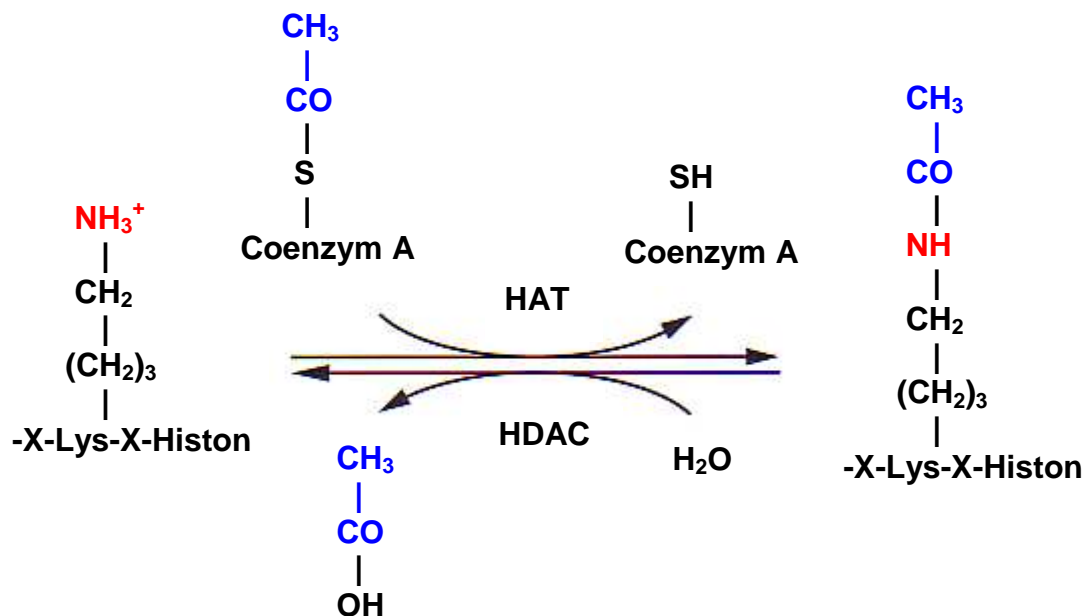


Abb. 3: Darstellung der Azetylierung und Deazetylierung der ϵ -Aminogruppe in Histonen.

2.4 Histondeazetylasen

Die HDACs führen zu einer verminderten Gentranskription, zu einer verminderten Differenzierung, zu einer erhöhten Zellüberlebensrate und zu einer unregulierten Proliferation. Dabei wird von Studien bestätigt, dass die HDAC-Aktivität in Tumorzellen massiv erhöht ist (Roth et al., 2001; Senguputa und Seto, 2004; Drummond et al., 2005). Pogo und Kollegen postulierten schon bereits vor 40 Jahren, dass die posttranslationale Histonzetylierung mit der erhöhten transkriptionellen Aktivität in eukaryontischen

Zellen korreliert (Pogo et al., 1966). Im Folgenden konnte man wichtige Verbindungen zwischen dieser Chromatinmodifikation durch Histonazetylierung und der transkriptionellen Regulation herstellen. Hebbes und Kollegen haben festgestellt, dass hyperazetylierte Histone in bestimmten besonders aktiven Domänen des Euchromatins angereichert werden (Hebbes et al., 1988). Hypoazetylierte Histone hingegen akkumulieren in transkriptionell inaktiveren Regionen wie Heterochromatin oder im inaktivierten X-Chromosom der Säugetiere (Braunstein et al., 1993).

Die HDACs werden aufgrund ihrer Struktur und Funktion üblicherweise in drei verschiedene Klassen unterteilt: Die Klasse I besitzt eine grosse Ähnlichkeit zum Hefeprotein Rpd3 (reduced potassium dependency 3) und enthält die HDACs 1, 2, 3, 8 und 11. Die Klasse II, homolog zum Hefeprotein Hda1 (histone deacetylase 1), enthält die HDACs 4, 5, 6, 7, 9 und 10. Die HDACs der Klasse I und II sind zinkabhängige Amidohydrolasen, die im Zusammenspiel mit den entsprechenden Enzymen die Übertragung beziehungsweise die Abspaltung eines Azetylrestes an der ϵ -Aminogruppe der Lysine am N-Terminus katalysieren (De Ruijter et al., 2003). Die am wenigsten erforschte Klasse III, welche homolog zum Hefeprotein Sir2 (silent information regulator 2) ist, und mit SIRT1-7 benannt wird (Frye, 2000), ist im Gegensatz zu den anderen beiden Klassen von NAD⁺ (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) abhängig (Imai et al, 2000). Zusätzlich kann die Klasse III im Vergleich zu den anderen beiden Klassen nicht durch Trichostatin A, ein HDAC-Hemmer, gehemmt werden (Imai et al., 2000). Die HDACs der Klasse I befinden sich im Nukleus der eukaryontischen Zelle, während die HDACs der Klasse II sich entweder im Nukleus oder im Zytoplasma der eukaryontischen Zelle befinden (De Ruijter et al., 2003). Die HDACs der Klasse II werden durch bestimmte Transportproteine vom Nukleus ins Zytoplasma oder umgekehrt befördert (Kao et al., 2001). Die **Tabelle 1** zeigt die bisher im Menschen und in der Hefe identifizierten HDACs.

Tabelle 1: Identifizierte Histondeazetylasen im Menschen und in der Hefe

HDAC-Klassen	HDAC-Proteine im Menschen	HDAC-Proteine in der Hefe
Klasse I	HDACs 1, 2, 3, 8 und 11	Rpd3
Klasse II	HDACs 4, 5, 6, 7, 9 und 10	Hda1
Klasse III	SIRT 1-7	Sir2

Die HDACs und HATs liegen in der Zelle als hochmolekulare Multiproteinkomplexe mit Co-aktivator- oder Co-repressoraktivität vor. HDAC1 und HDAC2 gehören den Multiproteinkomplexen Sin3 (switch independent 3) und NURD (nucleosome remodeling and deacetylation) an (Ahringer, 2000). Dabei konnten Heinzl und Kollegen zeigen, dass der Multiproteinkomplex bestehend aus HDACs und Sin3 zur transkriptionellen Repression führt (Heinzl et al., 1997). Die Multiproteinkomplexe können über Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel Steroidhormonrezeptoren (nuclear hormone receptors, NR) oder Thyroidhormonrezeptoren (TR) an die DNA binden (Cress und Seto, 2000). Co-repressoren, die als Brücken zwischen HDAC-Komplexen und Transkriptionsfaktoren fungieren, sind beispielsweise SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors) und N-CoR (nuclear receptor co-repressor) (Xu et al., 1999). Zurzeit weiss man, dass die Co-repressoren SMRT und N-CoR als Co-faktoren an die HDACs 3, 4, 5 und 7 binden (Guenther et al., 2001; Fischle et al. 2001, 2002). In **Abb. 4** soll schematisch dargestellt werden, wie die HDACs in Multiproteinkomplexen über Co-repressoren und Transkriptionsfaktoren an die DNA binden können und somit die Transkription von Zielgenen unterdrücken können.

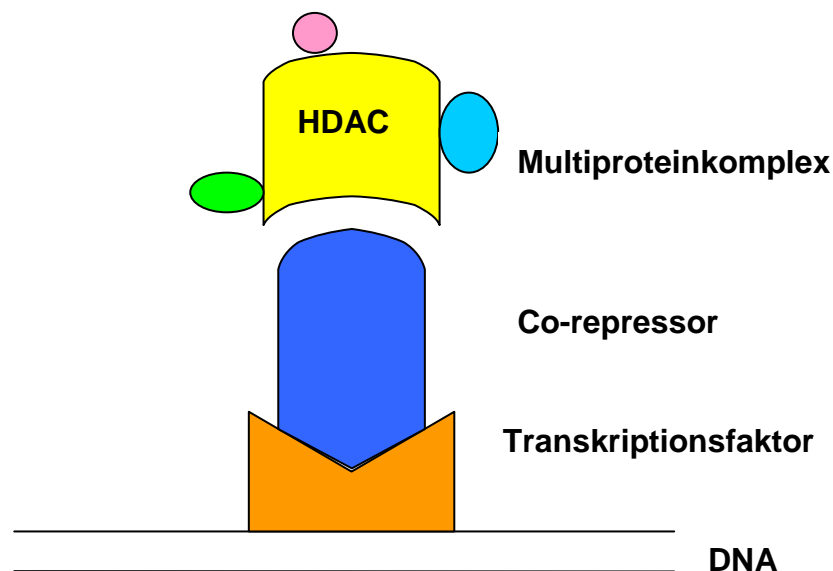


Abb. 4: Schematische Darstellung der Bindung des Multiproteinkomplexes an die DNA.

2.5 Der epigenetische Code

Es wird vermutet, dass die Expression der Gene nicht nur alleine durch den DNA-Code determiniert wird (Mai et al., 2005). Die Epigenetik befasst sich mit dem Studium von veränderten Genfunktionen, die mitotisch oder meiotisch vererbbar sind und keine veränderte DNA-Sequenz beinhalten (Lengauer et al., 1998; Jones und Laird, 1999). Der wichtigste Unterschied zwischen epigenetischen und genetischen Mechanismen besteht darin, dass epigenetische Veränderungen durch chemikalische Agenzien reversibel gemacht werden können (Verma und Srivastava, 2002). Die zwei Hauptmechanismen der Epigenetik bestehen in der Modifikation von Histonproteinen und der DNA-Methylierung.

Die DNA-Methylierung verändert die Interaktion zwischen Proteinen und DNA. Dies führt zur Veränderung der Chromatinstruktur und somit zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Transkriptionsrate, abhängig davon, ob positiv- oder negativ-regulierende Gene involviert sind (Mai et al., 2005). Speziell die Methylierung von CpG-Inseln, das sind an der C5-Position methylierte Cytosine, führt zur Bindung von diversen Proteinen (z.B. Sin3), welche HDACs oder andere Transkriptionsrepressoren rekrutieren, um eine stark kondensierte Chromatinstruktur zu bilden. Die stark kondensierte Chromatinstruktur verhindert das Andocken von Transkriptionsfaktoren. Folglich werden bestimmte Gene nicht mehr produziert, die zum Beispiel das Wachstum von Tumorzellen verhindern könnten (Jones, 1998; Nan, 1998). Viele Tumorsuppressorgene, die in diversen Tumoren inaktiviert sind, haben stark methylierte Promotoren; unter normalen Bedingungen sind die Promotoren unmethyliert und die spezifischen Gene werden transkribiert (Esteller et al., 1999).

Der zweite Hauptmechanismus der Epigenetik besteht in einem komplexen Netzwerk von Modifikationen (Azetylierung, Phosphorylierung und Methylierung) von Seitenketten der Histone. Dabei entstand die Histoncode-Hypothese, die sich mit der genspezifischen Transkriptionskontrolle auseinandersetzt. Die Histoncode-Hypothese besagt, dass die Expression eines Gens davon abhängig ist, welcher Lysinrest an bestimmten Histonen azetyliert ist. Der unterschiedliche Azetylierungsstatus führt dann zu einer veränderten Chromatinstruktur und damit zu einer unterschiedlichen Genexpression. Es wird vermutet, dass der Code durch Histon-modifizierende Enzyme gesetzt wird und durch Non-Histonproteine entziffert wird. Man nimmt an, dass das Nukleosom fähig ist, epigenetische Informationen von einer Zellgeneration zur nächsten zu übertragen (Strahl und Allis, 2000; Jenuwein und Allis, 2001; Turner 2002).

Die Epigenetik ist wichtig für die Tumorzellforschung, weil mit chemischen Agenzien die Transkription von bestimmten Tumorsuppressorgenen gefördert werden könnte, indem die Seitenketten von Histonen zum Beispiel durch die Azetylierung modifiziert werden.

2.6 Histondeazetylasen-Hemmer

Die HDACs spielen eine wichtige Rolle in der Karzinogenese, da sie die Differenzierung, die Proliferation und die Apoptose eukaryontischer Zellen beeinflussen. Man hat festgestellt, dass in Tumorzellen die HDACs überexprimiert werden, und dabei die Transkription von spezifischen Tumor supprimierenden Genen verändert oder sogar erniedrigt sein kann. Es wurden mehrere klein-molekulare Hemmer gegen die verschiedenen Typen von HDACs identifiziert, und einige davon (z.B. SAHA) werden schon auf klinischer Basis untersucht. Mehrere Studien zeigen, dass die HDAC-Hemmer Gene reaktivieren können, welche die Zellproliferation abschwächen, die Apoptose fördern und somit die Effizienz von Chemo- und Radiotherapie steigern (Sengupta und Seto, 2004; Dokmanovic und Marks, 2005; Drummond et al., 2005). Die Entdeckung von HDAC-Hemmer, welche in der Lage sind, die durch Hemmung von HDACs eine Verschiebung des dynamischen Gleichgewichts der Azetylierung von Histonen in Richtung Hyperazetylierung herbeizuführen, bedeutete für die Forschung einen immensen Fortschritt bei der Untersuchung der Bedeutung dieser Chromatinmodifikationen (Yoshida et al., 1990). Es gibt 6 verschiedene Klassen von HDAC-Hemmer (Drummond et al., 2005). Diese sind:

- kurzkettige Fettsäuren (z.B. VPA)
- Hydroxamsäuren (z.B. TSA und SAHA)
- zyklische Tetrapeptide mit einem 2-Amino-8-Oxo-9,10-Epoxy-Decanoyl (AOE)-Rest
- zyklische Tetrapeptide ohne einen AOE-Rest
- Benzamide
- Hybridmoleküle

HDAC-Hemmer vom Hydroxamsäure-Typ, z.B. TSA und SAHA, haben drei basische Komponenten (**Abb. 5**):

- (a) Ein Hydroxamsäureteil, das die Oberfläche von HDACs erkennt.
- (b) Ein hydrophobes Distanzstück („spacer“), das eine optimale Länge hat, um die Länge der hydrophoben Tasche der HDAC auszuspannen.
- (c) Eine hydrophobe Kappe („cap“), die den Eingang zur aktiven Seite blockiert

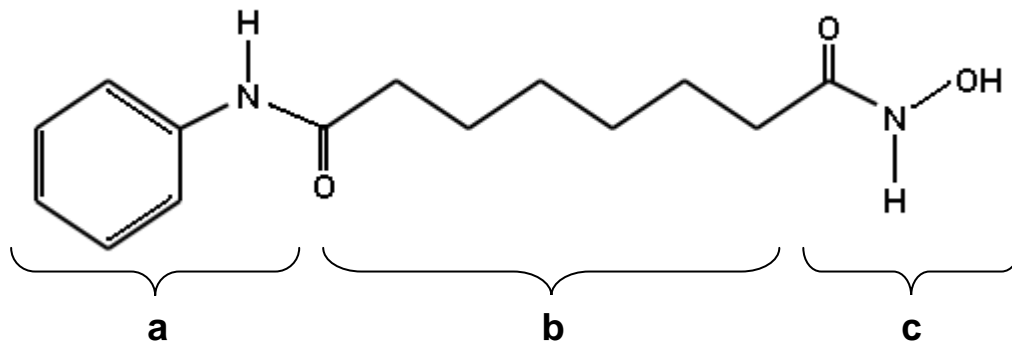


Abb. 5: Schematische Darstellung des HDAC-Hemmers SAHA.

a, Hydroxamsäureteil; b, „spacer“; c, „cap“

Die HDACs besitzen eine Tasche, die ein Zink-Ion enthält, welches über Wasserstoffbrücken mit einem Histidinrest, zwei Aspartatresten und einem Wassermolekül in Verbindung steht. Das Zink-Ion der HDACs ist der Angriffspunkt für HDAC-Hemmer. TSA beispielsweise bindet an die HDAC, indem es seine lange aliphatische Kette in die HDAC-Tasche einschleust und multiple Kontakte (van der Waals-Kräfte) mit hydrophoben Resten der Tasche bildet (Finnin et al., 1999).

Wie schon erwähnt, bewirken die HDAC-Hemmer Wachstumsstopp, Differenzierung und Zelltod in Tumorzellen (Sengupta und Seto, 2004; Dokmanovic und Marks, 2005; Drummond et al., 2005). HDAC-Hemmer können die Angiogenese in Tumorzellen hemmen, die Caspase-abhängige Apoptose und auch den Caspasen-unabhängigen autophagolytischen Zelltod auslösen (Kim et al., 2001; Henderson et al., 2003; Shao et al., 2004; Ungerstedt et al., 2005). Daneben induzieren die HDAC-Hemmer eine Akkumulation von azetylierten Histonen in Tumorzellen, welche den Zellzyklus in der G1- und der G2-Phase arretiert. Die Arretierung des Zellzyklus wird durch die HDAC-

Hemmer verursachte erhöhte Transkriptionsrate des p21-Gens erklärt, welches ein wichtiger Faktor in der Zellzyklussteuerung ist (Richon et al., 1998, 2000).

In Microarrays hat man das Transkriptionsprofil von HDAC-Hemmer untersucht und erstaunlicherweise entdeckt, dass nur zirka 2% der mRNA durch HDAC-Hemmer moduliert wird (Glaser et al., 2003). Diese Befunde lassen vermuten, dass die Regulation der Genexpression durch Azetylierung ein hoch selektiver Prozess ist.

Die HDAC-Hemmer induzieren im Gegensatz zu den Tumorzellen in den gesunden Zellen keinen Zelltod (Ungerstedt et al., 2005). Klinische Studien bestätigen, dass die HDAC-Hemmer eine hohe Antitumoraktivität gegenüber einem breiten Spektrum von Neoplasien aufweisen, und bei Krebspatienten die therapeutische Konzentration auf toxikologischer Ebene sehr gut toleriert wird (Kelly et al., 2005).

2.6.1 Trichostatin A

Trichostatin A (TSA) war der erste HDAC-Hemmer, der beschrieben wurde (Yoshida et al., 1990). TSA ist ein Fermentationsprodukt aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus*. TSA wurde erst als Mykolytikum eingesetzt, später entdeckte man, dass es die Proliferation von Tumorzellen hemmt. TSA gehört zu der Gruppe der Hydroxamsäuren (**Abb. 7**) und wirkt *in vitro* schon in nanomolaren Konzentrationen.

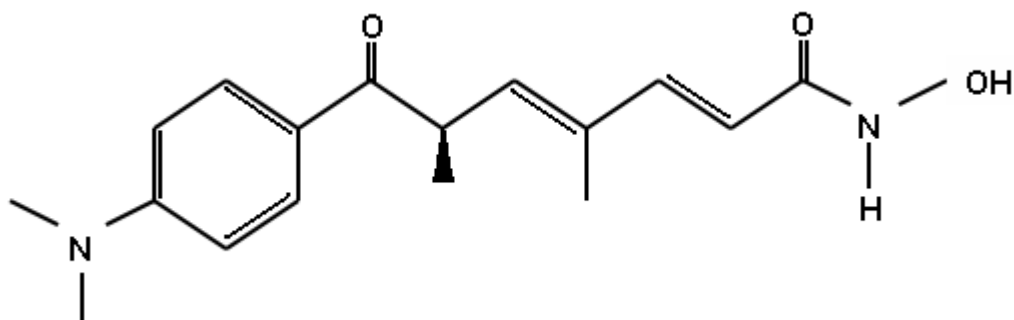


Abb. 7: Molekulare Darstellung von TSA.

Da die Produktion von TSA sehr teuer und ineffizient ist, werden andere wirksame HDAC-Hemmer gesucht. Zurzeit ist Oxamflatin das einzige Medikament in der Hydroxamsäuregruppe, dass *in vitro* die gleiche Potenz wie TSA aufweist (de Ruijter et al., 2003). Zahlreiche Studien zeigen, dass TSA eine hohe Antitumor-Aktivität aufweist.

Im folgenden werden einige Beispiele wiedergegeben: TSA hemmt die Proliferation und fördert die Apoptose in hepatozellulären Karzinomen und blockiert den Zellzyklus in Ovarialkarzinomen, indem das p21-Gen hinaufreguliert wird (Herold et al., 2002; Strait et al., 2002; Richon et al., 2000), wobei Yoshida und Beppu schon in den 90er-Jahren postulierten, dass TSA einen Zellzyklusarrest induziert (Yoshida und Beppu, 1988). Jang und Kollegen zeigten, dass TSA die vermehrte Expression von Östrogen-Rezeptoren in chemoresistenten Mammakarzinomzellen förderte, welche daraufhin gegenüber dem Zytostatikum Tamoxifen sensibilisiert wurden (Jang et al., 2004). TSA hat auch die Fähigkeit via transkriptionaler Aktivierung das Membrananker-Glykoprotein RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs) in humanen Lungentumorzellen hinaufzuregulieren. RECK hemmt die Matrixmetalloprotease 2 (MMP-2), die Tumormetastase und die Angiogenese von Tumorzellen (Liu et al., 2003).

2.6.2 Suberoylanilid-Hydroxamsäure

Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA), welches wie TSA zu der Gruppe der Hydroxamsäuren gehört (**Abb. 8**), hemmt die HDACs in mikromolarer Konzentration und führt wie TSA zu einem Zellzyklusarrest (Richon et al., 1998). SAHA bewirkt in normalen gesunden Zellkulturen eine Erhöhung des reduzierten Proteins Thioredoxin (TRX-SH-SH), welches das ROS (free radical oxygen species) bindet. ROS ist ein Radikal, das den Zelltod induzieren kann. In transformierten Zellen, welche eine erhöhte Menge an Thioredoxin enthalten und somit eine Resistenz gegenüber Zytostatika entwickeln, induziert SAHA die Expression von TBP-2 (thioredoxin binding protein 2), welches Thioredoxin bindet und inaktiviert. Durch diesen Mechanismus wird ROS freigesetzt, und somit die Induktion des Zelltodes ermöglicht (Butler et al., 2002; Ungerstedt et al., 2005). In einer Studie wurde gezeigt, dass SAHA eine Polyploidie in humanen Kolonkarzinomzelllinien und humanen Mammakarziomzelllinien induzieren kann. In den polyploiden Zellen findet eine kontinuierliche DNA-Synthese mit fehlerhafter Zytokinese statt. Dabei verlieren die Tumorzellen die Fähigkeit zur Proliferation und fangen an zu altern (Xu et al., 2005).

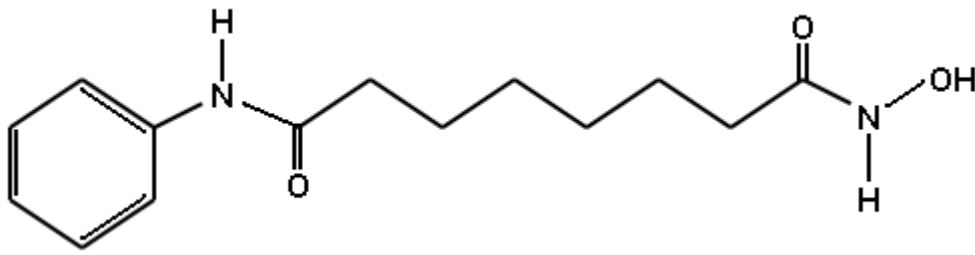


Abb. 8: Molekulare Darstellung von SAHA

2.6.3 Valproinsäure

Die Valproinsäure (VPA) gehört zur Gruppe der kurzkettigen Fettsäuren (**Abb. 9**). VPA wird vor allem für die Therapie von Epilepsien eingesetzt. Man konnte erst in letzter Zeit zeigen, dass VPA HDACs hemmen kann (Göttlicher et al., 2001). VPA hemmt die Angiogenese von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo*, induziert eine Differenzierung in Tumorzellen und wirkt auf Gene, die für die Proliferation und die Apoptose relevant sind (Gurvich et al., 2004; Michaelis et al., 2004; Thelen et al., 2004; Blaheta et al., 2005). In humanen Endometriumzellen konnte man nachweisen, dass VPA über die Arretierung des Zellzyklus das Wachstum von Tumorzellen hemmte. Bei akuten myeloischen Leukämiezellen, welche das zur Chemoresistenz führende p-Glykoprotein und Protein MRP1 enthielten, konnte durch VPA die Proliferation gehemmt und die Apoptose induziert werden (Takai et al., 2004; Tang et al., 2004). Der Nachteil der VPA ist, dass sie gegenüber den HDACs der Klasse II sehr schwach wirken und teratogene Nebenwirkungen mit sich führen (Göttlicher et al., 2001).

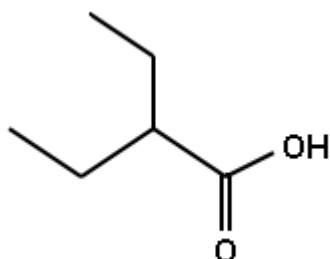


Abb. 9: Molekulare Darstellung von VPA

2.7 Chemoresistenz

Der Gebrauch und die Wirkung von Medikamenten im Allgemeinen und von Chemotherapeutika bei der Krebsbekämpfung im Speziellen werden durch das Phänomen der Resistenz eingeschränkt. Der Begriff Chemoresistenz ist vielseitig definiert und wird deshalb für verschiedene Teilbereiche verwendet. Es wird unter anderem unterschieden zwischen physiologischer Resistenz, biologischer Resistenz, biochemischer Resistenz, und jeweils auch noch zwischen intrinsischer („de novo“) und erworbener („acquired“) Resistenz. Etwas vereinfacht gesagt, ist die intrinsische Resistenz schon *vor* einer Exposition mit einem Chemotherapeutikum vorhanden, während bei der erworbenen Form die Resistenz *nach* einer Exposition mit einem Chemotherapeutikum auftritt - meist durch Selektion durch das Chemotherapeutikum bis sich ein stabiler Chemoresistenzphänotyp durchgesetzt hat. Die einzelnen Resistenzformen sind in vielen Übersichtsarbeiten und Büchern detailliert beschrieben (z.B. in: Cancer drug resistance, ed. B.A. Teicher, 2006; Roberti et al., 2005; Larsen et al., 2000) und sollen hier nicht weiter ausgeführt werden. Die molekularen, biologischen und physiologischen Ursachen der Chemoresistenz sind vielfältig und zeigen sich oftmals in Veränderungen in Zellzyklus- und/oder Apoptoseverhalten, im Umsatz von Metaboliten, im Transport von Chemotherapeutika in die Tumorzelle hinein oder aus der Tumorzelle hinaus, und in der Effizienz und Präzision von DNA-Reparaturprozessen. Klar scheint jedenfalls, dass nicht nur ein Gen oder eine kleine Gruppe von Genen für die Chemoresistenz verantwortlich ist, sondern das Resultat von multiplen interagierenden Faktoren ist.

Im Folgenden wird auf zwei Ursachen von Chemoresistenz näher eingegangen. Es sind dies zum einen eine spezielle Form der DNA-Reparatur, nämlich die DNA Mismatch Reparatur (=DNA Mismatch Repair), welche eine wichtige Rolle in der Chemoresistenz spielt, und zum anderen ein relativ neuer Resistenztyp, nämlich derjenige verursacht durch die Histondeazetylasen-Hemmern.

2.7.1 Chemoresistenz durch defekte DNA Mismatch Reparatur

Genmutation, d.h. Veränderungen in der DNA-Basensequenz, können unter Umständen zur Bildung von Zellvarianten führen, welche auf Kosten anderer Zellen unkontrolliert wachsen können. Im Extremfall kann dieses unkontrollierte Zellwachstum zu Krebs führen. Um dies zu verhindern - oder wenigstens einzudämmen – haben sich verschiedene Systeme in der Zelle entwickelt, welche solche Replikationsfehler

erkennen und korrigieren können. Eines davon ist das so genannte DNA Mismatch Repair (MMR)-System. Seine Funktion besteht in der Erkennung und Reparatur von fehlgepaarten („mismatched“) DNA-Basenpaaren, welche während der Replikation spontan auftreten können. Dieses System besteht beim Menschen aus mehreren Proteinen mit definierten Funktionen. Die einen (MSH2, MSH3, MSH6) erkennen die Basenfehlpaarungen und die anderen (MLH1, PMS2, PMS1) sind, zusammen mit anderen Replikations- und Reparaturproteinen (u.a. Nukleasen, Polymerasen und Ligasen), für die eigentliche Reparatur zuständig und wahrscheinlich auch für die Signalübertragung zur Steuerung des Zellzyklus und für die Aktivierung der Apoptose zuständig. Dieses MMR-System trägt daher entscheidend zur Erhaltung der DNA-Basensequenz (Genomstabilität) und zur Reduktion der Mutationsrate bei. Die Eigenschaften und Funktionen des MMR-Systems sind in zahlreichen Übersichtsarbeiten detailliert beschrieben (u.a.: Modrich und Lahue, 1996; Jiricny, 1998; Kolodner und Marsischky, 1999; Marra und Schär, 1999; Fedier und Fink, 2004). Bei Defekten im MMR-System durch Mutationen in den MMR-Genen kann diese Reparaturfunktion nicht mehr ausgeübt werden, was zu einer Anhäufung von Replikationsfehlern und Mutationen in den Genen selbst aber auch in nicht-kodierenden Abschnitten im Genom (Mikrosatelliten) führt (Eshleman et al., 1996; Duval und Hamelin, 2002). Dies kann zu Krebs führen (Fishel und Kolodner, 1995; Jiricny und Nyström-Lahti, 2000; Peltomäki, 2003). Eine vererbare Form ist das so genannte „hereditary non-polyposis colon cancer“ (HNPCC)-Syndrom beim Menschen, direkt verursacht durch Mutationen in MMR-Genen. Es gibt auch sporadische (nicht-erbliche) Formen, welche in den meisten Fällen durch die epigenetische Stilllegung („silencing“) des MLH1-Gens durch Promotorhypermethylierung verursacht werden und welche zu einem Fehlen des MLH1-Proteins führen (Herman et al., 1998). Bei Mammakarzinomen konnte eine reduzierte MLH1-Expression gefunden werden (Murata et al., 2005).

Eine andere wichtige Fähigkeit des MMR-Systems ist es, bei DNA-Schäden den Zellzyklus zu stoppen und - im Falle von DNA-Schädigungen grösseren Ausmasses - die Apoptose einzuleiten (Hawn et al., 1995; Brown et al., 1997; D'Atri et al., 1998; Zhang et al., 1999; Li, 1999; Bellacosa, 2001). Viele Studien einschliesslich diejenigen dieses Labors zeigten, dass Tumorzellen mit defektem MMR-System gegenüber einer Vielzahl von Zytostatika resistent waren. So zeigten MMR-defiziente Zellen eine Resistenz gegenüber Topoisomerase-Inhibitoren wie z.B. Doxorubicin und Etoposid (Fedier et al., 2001), Platinverbindungen wie z.B. Cisplatin und Carboplatin (Fink et al.,

1996), alkylierende Agenzien wie z.B. Temozolomid (Friedman et al., 1997) und Antimetaboliten wie z.B. 6-Thioguanin (Swann et al., 1996). Andere Zytostatika hingegen blieben auch in MMR-defizienten Zellen wirksam, wie z.B. Taxane (Aebi et al., 1997; Fedier et al., 2001), einige DNA-interkalierende Substanzen wie Brostallicin (Fedier et al., 2003) und einige Platinverbindungen wie z.B. Oxaliplatin (Fink et al., 1996). Leider gibt es zurzeit nur wenige Substanzen, die spezifisch bei MMR-defizienten Tumorzellen wirken. Die Entdeckung von neuen Zytostatika, welche eine spezifische Wirkung gegen MMR-defiziente Tumorzellen aufweisen, und die Bestrebung, durch molekulare, genetische und pharmakologische Methoden die MMR-assoziierte Chemoresistenz zu umgehen, wird von grosser Bedeutung sein (Mackay et al., 2000; Samimi et al., 2000).

2.7.2 Chemoresistenz bei Histondeazetylasen-Hemmer

HDAC-Hemmer haben eine potente toxische Wirkung spezifisch in Tumorzellen, und einige davon sind bereits in klinischer Evaluation oder werden bereits in der Krebsbekämpfung angewandt (Dokmanovic und Marks, 2005; Rosato und Grant, 2004). Kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass Tumorzellen eine Resistenz gegenüber dem HDAC-Hemmer FK228 (ein Depsipeptid) entwickeln können, welche mit einer Expression der MDR1-Effluxpumpe assoziiert ist (Xiao et al., 2005; Yamada et al., 2006). Somit besteht die Möglichkeit, dass HDAC-Hemmer nicht nur potente Chemotherapeutika sondern auch potenzielle Verursacher von Chemoresistenz sind. Dies konnte kürzlich durch die Arbeiten von Dr. A. Fedier und seinem Arbeitsteam bestätigt werden. Sie konnten zeigen, dass eine sequenzielle, mehrfache Behandlung von MLH1-profizienten und -defizienten Tumorzellen mit ansteigenden Konzentrationen von SAHA zu stabilen, 2- bis 3-fachen SAHA-resistenten Zellvarianten führte. Die SAHA-resistenten Varianten waren ebenfalls 2- bis 3-fach kreuz-resistent gegenüber TSA und VPA. Der MLH1-Status der Zellen spielte dabei keine Rolle, und es zeigte sich auch, dass diese SAHA-induzierte Resistenz nicht mit der Expression von „Multidrug resistance“-Effluxpumpen (MDR1) assoziiert war. Dies liesse auf einen Resistenzmechanismus schliessen, der verschieden von demjenigen verursacht durch FK228 ist. Detaillierte Studien müssen dies allerdings erst noch zeigen.

2.8 Zielsetzung der Arbeit

Die für SAHA gezeigten Resultate sollen um den HDAC-Hemmer TSA erweitert werden. Ziel der Arbeit ist es - analog zu SAHA -, (i) durch sequenzielle, mehrfache Behandlung von MLH1-profizienten und MLH1-defizienten Zellen putativ TSA-resistente Varianten zu erzeugen sowie (ii) die eventuelle Kreuzresistenz gegenüber SAHA und VPA, (iii) die Stabilität (Reversibilität/Irreversibilität) dieser putativ resistenten Varianten und (iv) die Rolle von MLH1 bei einer allfälligen Resistenzentwicklung zu ermitteln. Sollte sich auch bei TSA eine Resistenzentwicklung zeigen, könnte dies ein wichtiger Hinweis für mögliche Komplikationen bei einer Krebstherapie sein.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellkulturmedien, -reagenzien und -materialien

G(enitacin)-418 (Sulfat)	Invitrogen, Basel, Schweiz
HBSS (Hepes Buffered Saline Solution)	Invitrogen, Basel, Schweiz
Iscove's modified Dulbecco's Medium	Invitrogen, Basel, Schweiz
Fötale Rinderserum (FCS), hitze-inaktiviert	Oxoid, Basel, Schweiz
Trypsin	Invitrogen, Basel, Schweiz

3.1.2 Zelllinien

Die (parentale) humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie HCT116 (ATCC CCL 247) stammt von einer Zellkulturbank (American Type Culture Collection). Die HCT116 Zelllinie trägt eine hemizygote Mutation im MLH1-Gen und exprimiert deshalb ein nicht-funktionelles MLH1-Protein und ist dementsprechend MMR-defizient (Boyer et al., 1995). Diese parentale HCT116 Zelllinie war Ausgangspunkt für die Herstellung der HCT116+ch3 Zelllinie, welche mit dem Chromosom 3 (trägt das Wildtyp-Gen für MLH1) komplementiert wurde (Koi et al., 1994) und somit MMR-profizient gemacht wurde. Aus Gründen der Chromosomen-Balance wurde ebenfalls eine Zelllinie HCT116+ch2 hergestellt (trägt zusätzlich das Chromosom 2), wobei diese MMR-inkompetent bleibt (Koi et al., 1994). Die drei Zelllinien waren im Labor vorhanden und wurden routinemässig kultiviert.

3.1.3 Histondeazetylasen-Hemmer

Trichostatin A (=TSA)	Sigma, Buchs, Schweiz
Suberoylanilid-Hydroxamsäure (=SAHA)	Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz
Valproinsäure (=VPA)	Sigma, Buchs, Schweiz

Die Substanzen wurden in Ethanol (TSA), in DMSO (SAHA) oder in Wasser (VPA) gelöst und als Aliquots bei -20°C gelagert.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden im Iscove's modified Dulbecco's Medium, ergänzt mit 10% FCS und Geneticin-418 (400 µg/ml), bei 95% relativer Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ und 37°C im Wärmeschrank (Inkubator; Brouwer, Luzern, Schweiz) in Zellkulturflaschen (25 cm²) kultiviert. In der Regel wurden die Zellen routinemässig alle 4-5 Tage umgesetzt (trypsinisiert und gesplittet), und ein Teil davon wurde beispielsweise mit einer 1:10 Verdünnung weiterkultiviert (propagiert). Falls notwendig wurde die Zelldichte, d.h. Anzahl Zellen pro Volumen Medium, mit einem Hämatozytometer (Neubauer-Kammer, Brand, Wertheim, Deutschland) bestimmt. Der andere Teil der Zellen wurde für die Durchführung der Experimente gebraucht. Dieses Vorgehen ist in **Abb. 10** schematisch beschrieben.

3.2.2 Erzeugung von mehrfach TSA-vorbehandelten Varianten

Die MLH1-profizienten (HCT116+ch3) und MLH1-defizienten (HCT116+ch2) Zellen wurden 8 Mal hintereinander mit ansteigenden Konzentrationen von TSA behandelt, beginnend mit 20 nM TSA. Dieser Wert entspricht der IC₉₀-Konzentration von TSA, welcher mit dem Clonogenic Assay ermittelt wurde (**Abb. 12**). Das Vorgehen war im Wesentlichen folgendes. Je 100'000 HCT116+ch3 Zellen und HCT116+ch2 Zellen in Medium wurden in 12.5 cm² Zellkulturflaschen angesetzt und 24 Stunden später mit TSA behandelt. Das TSA-enthaltende Medium wurde nach 72 Stunden durch TSA-freies Medium ausgewechselt. Dabei war klar zu beobachten, dass nach der TSA-Behandlung deutlich weniger Zellen in der Flasche waren. Die noch vorhandenen Zellen wurden zwecks Proliferierung für weitere 5-8 Tage kultiviert. Danach wurden die Zellen wiederum umgesetzt. Ein Teil der Zellen wurde bei -80°C eingefroren. Vom anderen wurden wiederum 100'000 Zellen angesetzt und mit TSA behandelt. Dieses Protokoll wurde 8 Mal wiederholt, wobei bei jeder „Runde“ die TSA-Konzentration bis zu einer Konzentration von 800 nM TSA erhöht wurde. Die Wachstumsraten aller vier Zelllinien waren vergleichbar. Sie wurde errechnet aufgrund der Verdopplungszeit zwischen einer Propagation und der darauf folgenden und über eine Beobachtungsperiode von 6 Wochen gemittelt. Die so erzeugten Subzelllinien wurden als HCT116+ch2/TSA (MLH1-defizient) und HCT116+ch3/TSA (MLH1-profizient) bezeichnet.

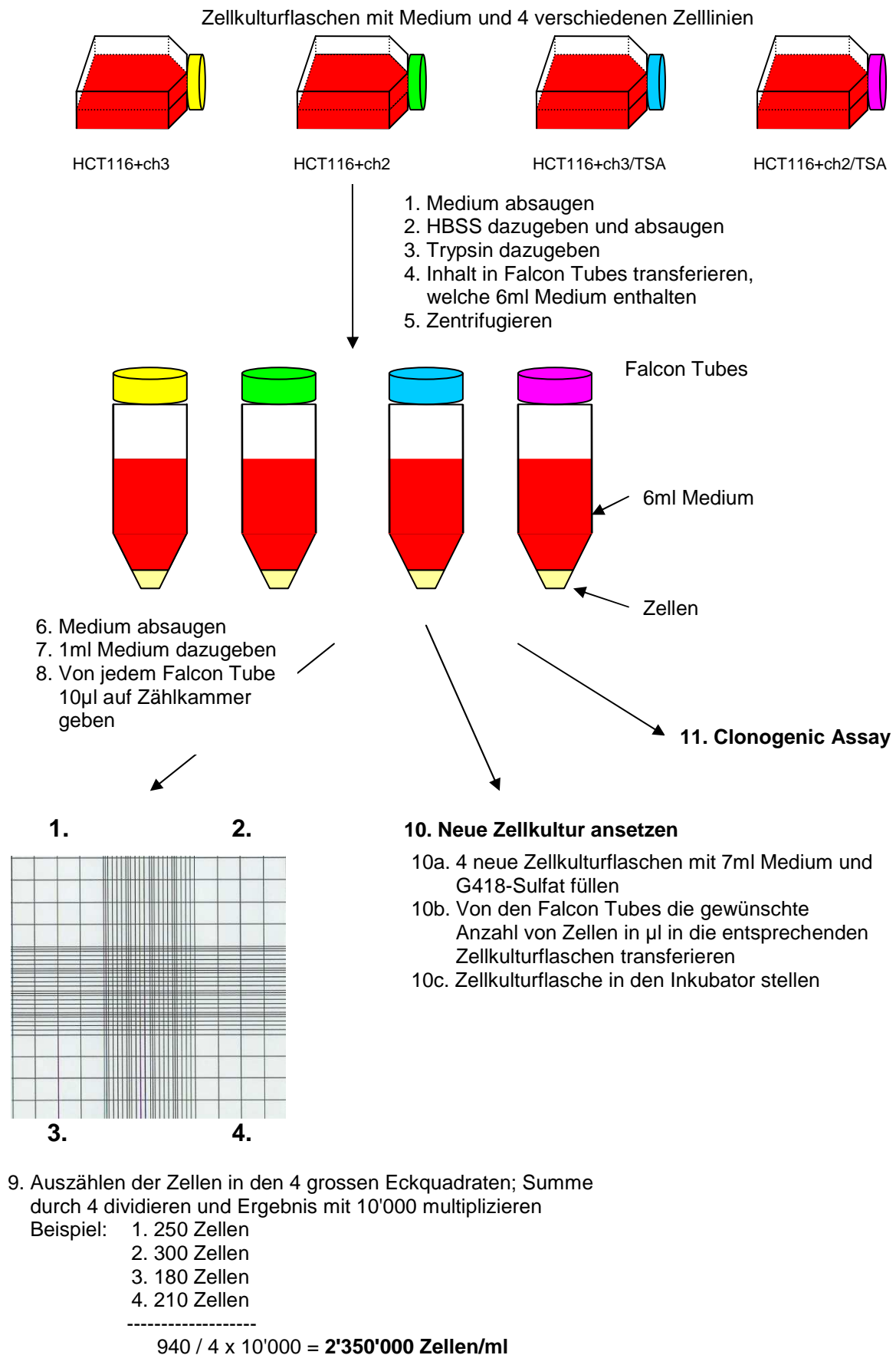


Abb. 10. Protokoll zur Zellkultivierung.

3.2.3 Clonogenic Assay und Giemsa-Färbung

Seit den sechziger Jahren wurden zur Testung der Empfindlichkeit (Sensitivität) und Resistenz von Tumorzellen viele Methoden entwickelt. Der Clonogenic Assay wurde erstmals 1977 beschrieben (Hamburger et al., 1977). Dabei werden Tumorzellen prätherapeutisch auf ihre Sensitivität gegenüber Zytostatika untersucht, indem ihr Wachstum, respektive ihre Fähigkeit zur Vermehrung (Koloniebildung) bestimmt wird.

Dieser Assay wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der Sensitivität der neu erzeugten (vorbehandelten) Subzelllinien HCT116+ch3/TSA und HCT116+ch2/TSA und derjenigen der entsprechenden nicht-vorbehandelten HCT116+ch3 und HCT116+ch2 Zelllinien gegenüber TSA, SAHA und VPA angewendet. Zu diesem Zweck wurde eine bestimmte Anzahl von Zellkulturschalen vorbereitet, in welchen Zellen (400) in 4ml Medium pro Zellkulturschale ausgesät werden. Die ersten drei Platten dienten als (unbehandelte) Kontrolle und wurden deshalb nicht behandelt. In die anderen (immer in Triplikaten) wurden nach 24 Stunden Inkubationszeit entweder TSA, SAHA oder VPA in verschiedenen Mengen dazugegeben (behandelte Kulturen). Danach wurden die Schalen im Inkubator für weitere 6-8 Tage zur Koloniebildung kultiviert.

Diese Kolonien wurden anschliessend mit Essigsäure:Ethanol (1:3-Mischung) fixiert (ca. 20 Minuten) und mit Giemsa gefärbt (ca. 20 Minuten). Nach der Färbung wurde die Giemsa-Lösung abgegossen und die Schalen wurden im Wasser geschwenkt (Auswaschen der Schalen) und getrocknet. Danach wurden die Zellkolonien unter dem Mikroskop gezählt. Eine Zellkolonie wird allgemein definiert als eine Ansammlung (Kolonie) von mindestens 50 Zellen. Dieses Vorgehen ist schematisch beschrieben in **Abb. 11**.

3.2.4 Auswertung und Statistik

Die relative Anzahl der Kolonien (angegeben in Prozent der unbehandelten Kontrolle) wurde gegen die Konzentration des entsprechenden Histondeazetylasen-Hemmer aufgetragen. Aus dem Diagramm wurden die IC_{50} -Werte für die Zelllinien und die entsprechenden Subzelllinien bestimmt. Jedes Experiment wurde mindestens 3-mal durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Alle angegebenen p-Werte beziehen sich auf den zweiseitigen Student's t-Test. Ein Wert $p < 0.05$ wird als statistisch signifikant betrachtet.

1. Pro Zellkulturplatte werden 400 Zellen / 4ml Medium benötigt: d.h. bei 9 Zellkulturplatten braucht man **3600 Zellen** (9 x 400 Zellen) und **36ml Medium** (9 x 4ml Medium)

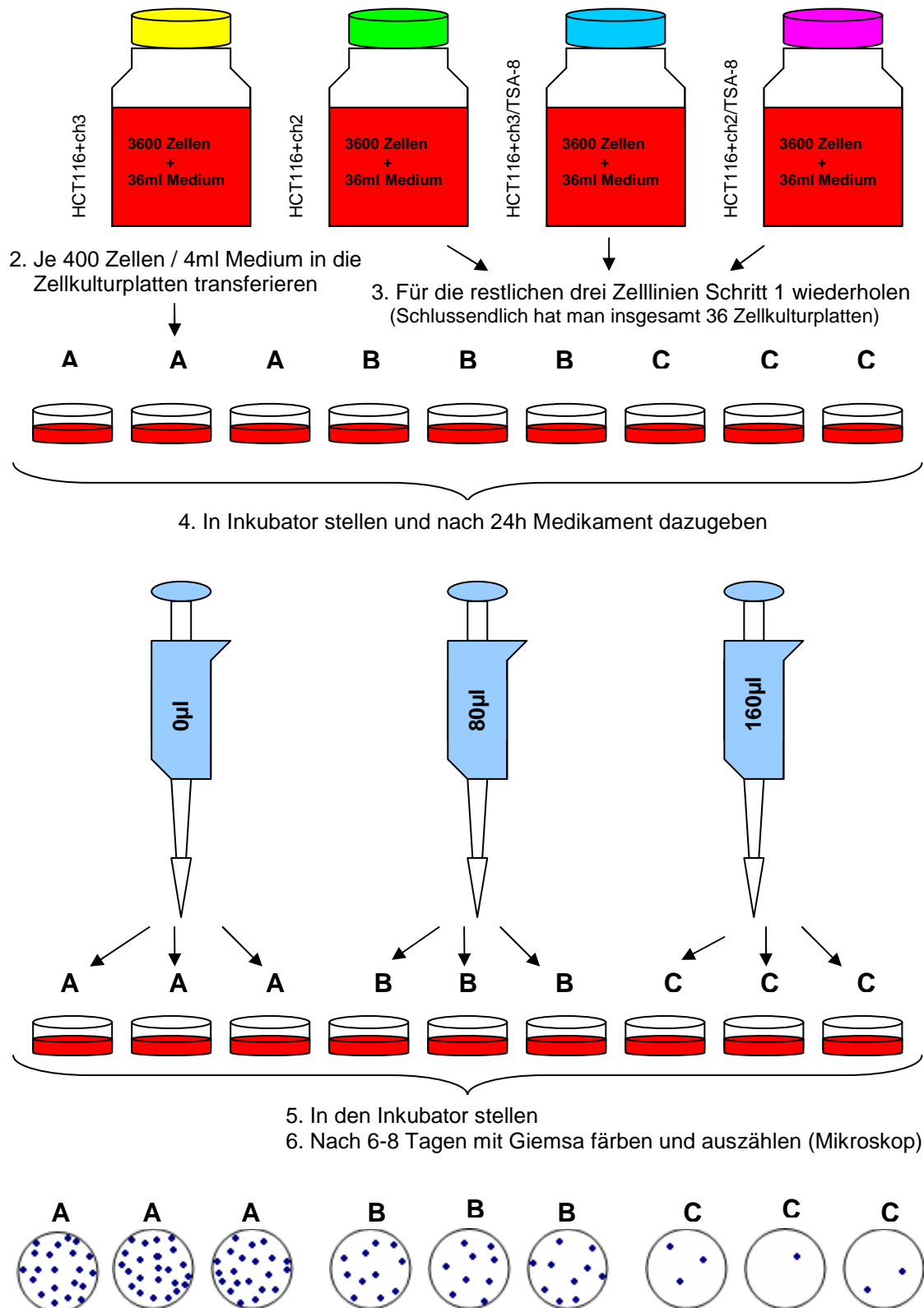


Abb. 11. Schematisch Darstellung des Clonogenic Assays.

4 Resultate

4.1 Herstellung der TSA-vorbehandelten Subzelllinien

Zur Herstellung der mehrfach-vorbehandelten Zelllinien wurde zuerst die IC_{90} -Konzentration, d.h. diejenige Konzentration von TSA, bei welcher 90% der Kolonien „verschwunden“ sind, beziehungsweise noch 10% zu sehen sind, mittels des Clonogenic Assays bestimmt. Die **Abb. 12** zeigt, dass diese Konzentration sowohl für die MLH1-defizienten (HCT116+ch2) als auch die MLH1-profizienten (HCT116+ch3) Kolonadenokarzinomzelllinien bei 20 nM TSA liegt. Dies bedeutet auch, dass der so genannte MLH1-Status der Zelllinien bezüglich der Sensitivität gegenüber TSA keine Rolle spielt, beziehungsweise die Sensitivität der Zelllinien MLH1-unabhängig ist.

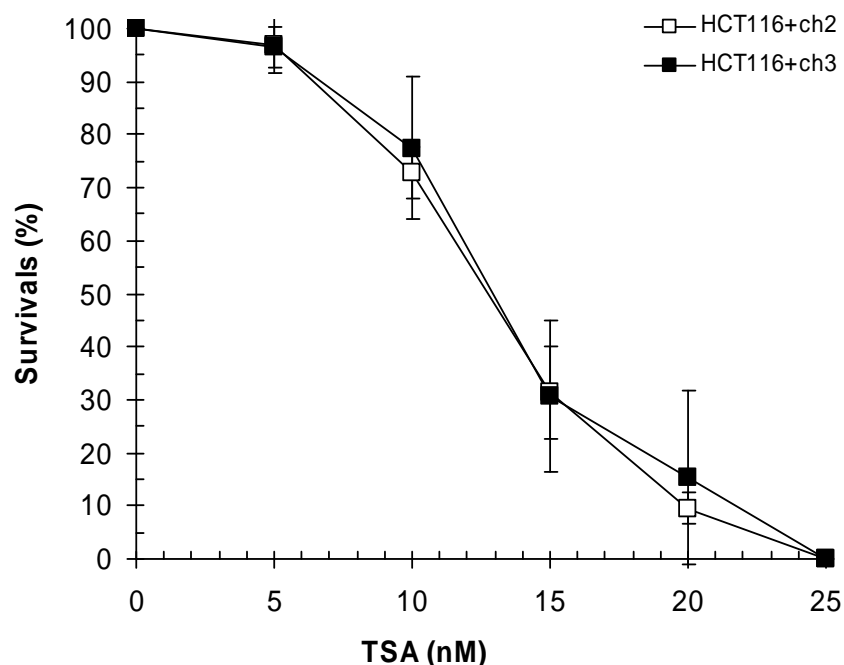


Abb. 12. Clonogenic Assay nach einer Behandlung von MLH1-defizienten (HCT116+ch2) und MLH1-profizienten (HCT116+ch3) Tumorzellen mit TSA. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Kolonien (= überlebende Zellen; Survivals) (y-Achse) als Funktion der Konzentration von TSA (x-Achse). Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) von drei unabhängigen Experimenten.

Ausgehend von dieser Anfangsselektionskonzentration (20 nM TSA) wurden die beiden Zelllinien solange repetitiv mit ansteigenden Konzentrationen von TSA (wie in der Methodik beschrieben) behandelt, bis entweder bei einer der beiden oder bei beiden

Subzelllinien eine relative Resistenz zu beobachten war. Dies schien nach 8 Wiederholungen bei einer Endselektionskonzentration von 800 nM TSA der Fall zu sein, und dies galt nun mit Clonogenic Assays zu überprüfen.

4.2 Sensitivität gegenüber TSA

Zu diesem Zweck wurde untersucht, ob die Subzelllinien, welche – wie oben beschrieben – 8-mal mit ansteigenden Konzentrationen von TSA vorbehandelt wurden, eine Resistenz, beziehungsweise eine verminderte Sensitivität gegenüber TSA aufweisen. Die Zellen wurden mit Konzentrationen von 0, 5, 10, 15, 20 und 25 nM TSA behandelt, und für die Auswertung wurde die relative Anzahl der Kolonien gegen die Konzentrationen von TSA aufgetragen (**Abb. 13**). Es zeigte sich, dass die MLH1-defiziente HCT116+ch2/TSA Subzelllinie eine verminderte Sensitivität gegenüber TSA aufweist, und dass sich offenbar eine Resistenz entwickelt hat.

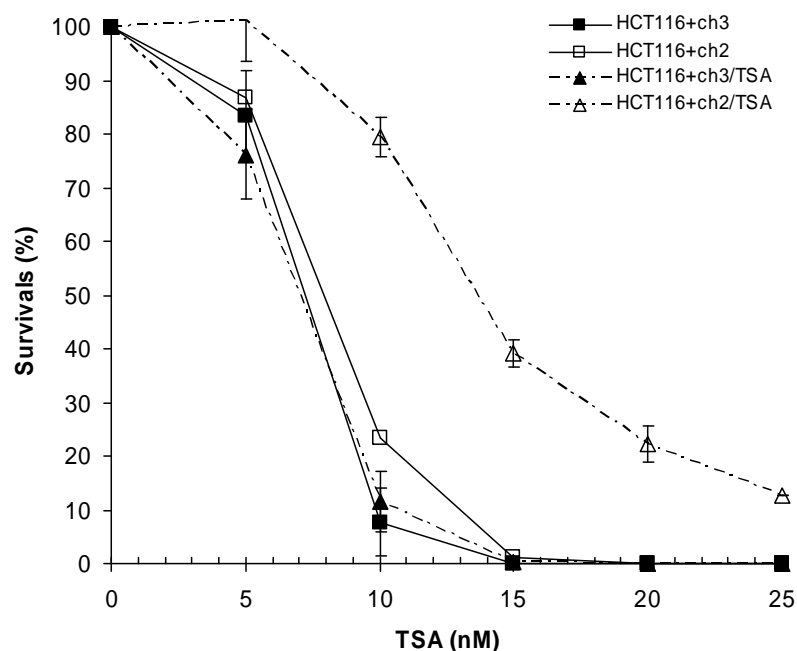


Abb. 13. Clonogenic Assay nach TSA Behandlung von MLH1-defizienten (HCT116+ch2) und MLH1-profizienten (HCT116+ch3) Tumorzelllinien (ausgezogene Linien) und der entsprechenden 8-mal vorbehandelten Subzelllinien (HCT116+ch2/TSA und HCT116+ch3/TSA; gestrichelte Linien). Der prozentuale Anteil von Kolonien (= Survivals; y-Achse) ist dargestellt als Funktion der TSA-Konzentration (x-Achse). Mittelwert \pm SD von 4 unabhängigen Experimenten.

Um die Sensitivitäten zu vergleichen, wurden die entsprechenden IC₅₀-Werte (d.h. diejenige Konzentration, bei welcher die Zahl der Kolonien um die Hälfte reduziert war) bestimmt. Diese Werte und die entsprechende Statistik sind untenstehend zusammengefasst (**Tab. 2**).

Tabelle 2: IC₅₀-Werte nach Behandlung mit TSA

Zelllinie	IC ₅₀ (nM) ^a	Resistenz ^b	p-Wert ^c
HCT116+ch2	8.0 ± 0.4		
HCT116+ch3	7.9 ± 1.6		
HCT116+ch2/TSA	14.1 ± 1.0	1.76	0.001
HCT116+ch3/TSA	7.2 ± 0.7	0.91	0.402

a) Mittelwerte ± SD von vier unabhängigen Experimenten. b) Resistenz; Verhältnis der IC₅₀-Werte zwischen der MLH1-defizienten Subzelllinie (HCT116+ch2/TSA) und der entsprechenden Zelllinie (HCT116+ch2), beziehungsweise zwischen der MLH1-profizienten Subzelllinie (HCT116+ch3/TSA) und der entsprechenden Zelllinie (HCT116+ch3). c) Statistische Signifikanz der Resistenz; p-Werte (Student's t-Test).

Der in der Tabelle dargestellte Vergleich zeigt, dass der IC₅₀-Wert für die MLH1-defiziente Subzelllinie HCT116+ch2/TSA deutlich (1.76-fach) grösser ist als der entsprechende Wert für die HCT116+ch2 Zelllinie. Der Unterschied ist zudem statistisch signifikant (p=0.001). Hingegen sind die entsprechenden Werte für die MLH1-profizienten Zellen nur geringfügig (0.91-fach) und statistisch nicht-signifikant (p=0.402) voneinander verschieden.

Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass die Vorbehandlung mit TSA nur bei der MLH1-defizienten HCT116+ch2 Zelllinie zu einer Resistenz führt, während dies bei der MLH1-profizienten HCT116+ch3 Zelllinie nicht der Fall ist. Damit scheint die Anwesenheit des MLH1-Proteins diese Resistenzentwicklung zu verhindern.

4.3 Sensitivität gegenüber SAHA

SAHA ist chemisch mit TSA verwandt und gehört ebenfalls zur Klasse der Hydroxamsäure-Typ HDAC-Hemmern. Die Frage war, ob die TSA-resistenten Subzelllinien auch so genannt kreuz-resistent gegenüber SAHA sind. Dies wurde wiederum mit einem Clonogenic Assay getestet. Die Resultate sind als Dosis-Wirkungsgraphik (**Abb. 14**) dargestellt und tabellarisch zusammengefasst (**Tabelle 3**).

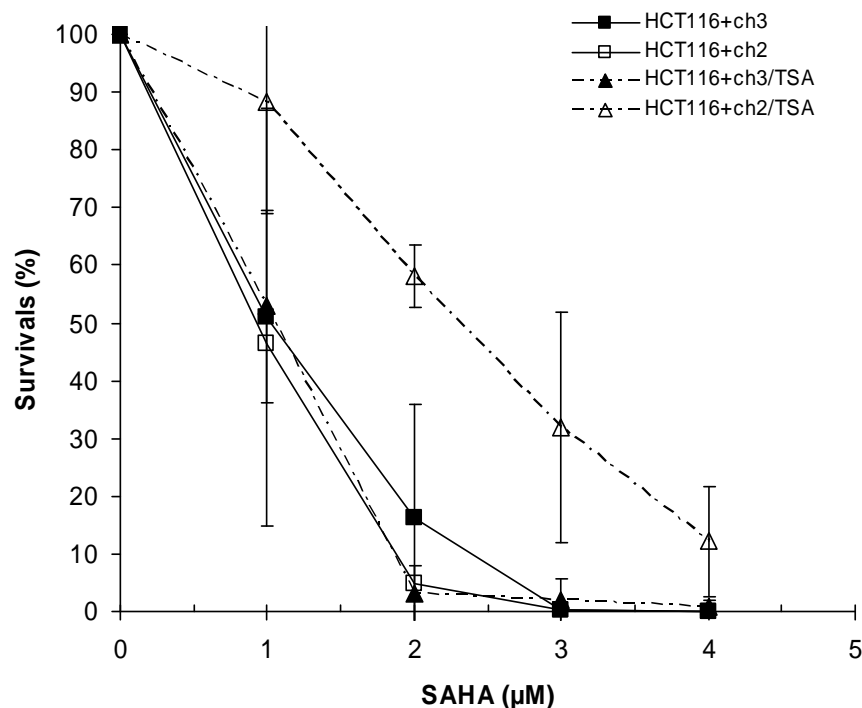


Abb. 14. Clonogenic Assay nach SAHA Behandlung von MLH1-defizienten (HCT116+ch2) und MLH1-profizienten (HCT116+ch3) Tumorzelllinien (ausgezogene Linien) und der entsprechenden 8-mal vorbehandelten Subzelllinien (HCT116+ch2/TSA und HCT116+ch3/TSA; gestrichelte Linien). Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Kolonien (= Survivals; y-Achse) als Funktion der Konzentration von SAHA (x-Achse). Mittelwert \pm SD von 4 unabhängigen Experimenten.

Wie schon bei der Behandlung mit TSA zeigte sich auch bei einer Behandlung der TSA-vorbehandelten Subzelllinien mit SAHA eine deutliche (2.5-fache) und statistisch signifikante ($p=0.002$) Resistenzentwicklung nur bei den MLH1-defizienten, nicht aber bei den MLH1-profizienten Zellen (1.1-fach, $p=0.749$).

Daraus kann gefolgert werden, dass die Vorbehandlung mit TSA bei der MLH1-defizienten HCT116+ch2 Zelllinie auch zu einer Kreuz-Resistenz gegenüber SAHA führt, und dass in diesem Zusammenhang die Abwesenheit des MLH1-Proteins eine Rolle spielt. Zudem ist auch ersichtlich, dass es keinen Sensitivitätsunterschied gegenüber SAHA zwischen den nicht-vorbehandelten MLH1-defizienten HCT116+ch2 und den MLH1-profizienten HCT116+ch3 Zelllinien gibt, da die entsprechenden IC₅₀-Werte nicht voneinander verschieden sind.

Tabelle 3: IC₅₀-Werte nach Behandlung mit SAHA

Zelllinie	IC ₅₀ (μM) ^a	Resistenz ^b	p-Wert ^c
HCT116+ch2	0.9 ± 0.4		
HCT116+ch3	0.9 ± 1.6		
HCT116+ch2/TSA	2.4 ± 0.3	2.52	0.002
HCT116+ch3/TSA	1.0 ± 0.4	1.10	0.749

a) Mittelwerte ± SD von vier unabhängigen Experimenten. b) Resistenz; Verhältnis der IC₅₀-Werte zwischen der MLH1-defizienten Subzelllinie (HCT116+ch2/TSA) und der entsprechenden Zelllinie (HCT116+ch2), beziehungsweise zwischen der MLH1-profizienten Subzelllinie (HCT116+ch3/TSA) und der entsprechenden Zelllinie (HCT116+ch3). c) Statistische Signifikanz der Resistenz; p-Werte (Student's t-Test).

4.4 Sensitivität gegenüber VPA

VPA ist chemisch nicht mit TSA oder SAHA verwandt und gehört zur Klasse der Carboxylat-Typ HDAC-Hemmern. Wiederum war die Frage, ob die TSA-resistenten Subzelllinien auch kreuz-resistent gegenüber VPA sind. Die Resultate des entsprechenden Clonogenic Assays sind in **Abb. 15** und in **Tabelle 4** zusammengefasst. Diese Resultate zeigen, dass – wie bei TSA und SAHA – die 8-malige Vorbehandlung mit TSA zu einer signifikanten (2-fach, p=0.001) Resistenzentwicklung, allerdings nur bei der MLH1-defizienten Zelllinie führt. Dies trifft nicht zu für die MLH1-profiziente Zelllinie (0.97-fach, p=0.659). Es zeigte sich ebenfalls, dass – analog zu TSA und SAHA – die beiden nicht-vorbehandelten Zelllinien vergleichbar sensitiv gegenüber VPA sind.

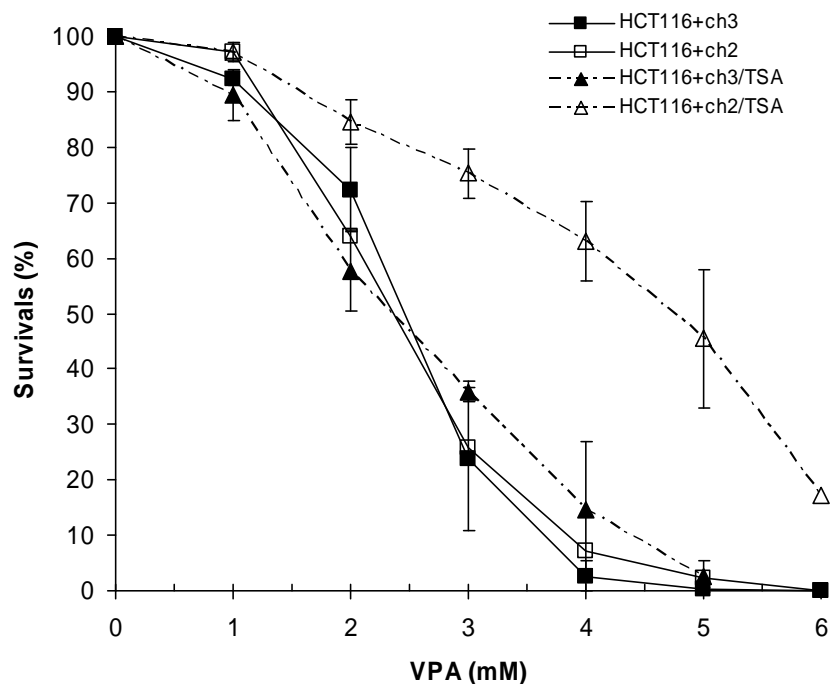


Abb. 15. Clonogenic Assay nach VPA Behandlung von MLH1-defizienten (HCT116+ch2) und MLH1-profizienten (HCT116+ch3) Tumorzelllinien (ausgezogene Linien) und der entsprechenden 8-mal vorbehandelten Subzelllinien (HCT116+ch2/TSA und HCT116+ch3/TSA; gestrichelte Linien). Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Kolonien (= Survivals; y-Achse) als Funktion der Konzentration von SAHA (x-Achse). Mittelwert \pm SD von 4 unabhängigen Experimenten.

Tabelle 4: IC₅₀-Werte nach Behandlung mit VPA

Zelllinie	IC ₅₀ (mM) ^a	Resistenz ^b	p-Wert ^c
HCT116+ch2	2.4 \pm 0.3		
HCT116+ch3	2.5 \pm 0.2		
HCT116+ch2/TSA	4.7 \pm 0.6	1.96	0.001
HCT116+ch3/TSA	2.4 \pm 0.4	0.97	0.659

a) Mittelwerte \pm SD von vier unabhängigen Experimenten. b) Resistenz; Verhältnis der IC₅₀-Werte zwischen der MLH1-defizienten Subzelllinie (HCT116+ch2/TSA) und der entsprechenden Zelllinie (HCT116+ch2), beziehungsweise zwischen der MLH1-profizienten Subzelllinie (HCT116+ch3/TSA) und der entsprechenden Zelllinie (HCT116+ch3). c) Statistische Signifikanz der Resistenz; p-Werte (Student's t-Test).

4.5 Stabilität der Resistenz

In der vorangegangenen Studie, bei welcher durch analoge Vorbehandlung von Tumorzellen eine Resistenz gegenüber SAHA und eine Kreuzresistenz gegenüber TSA und VPA erzielt werden konnte, zeigte sich, dass diese SAHA-induzierte Resistenz auch dann anhaltend war, wenn SAHA („Selektionsdruck“) nicht mehr im Kulturmedium vorhanden war. Die entsprechende Beobachtungsperiode dauerte knapp 6 Monate. Es wurde nun getestet, ob dies auch für TSA der Fall ist, d.h. ob die TSA-induzierte Resistenz nicht abbricht, wenn TSA nicht mehr im Kulturmedium vorhanden ist. Zu diesem Zweck wurde in periodischen Abständen, d.h. alle 3 Zellpropagationen, während knapp 4 Monaten Clonogenic Assays mit den vorbehandelten Zellen und den nicht-vorbehandelten Zellen durchgeführt. Danach zeigte sich, dass die TSA-induzierten, MLH1-defizienten Varianten ihre knapp 2-fache Resistenz im Vergleich mit den entsprechenden nicht-vorbehandelten, sensitiven Zellen beibehalten (**Tabelle 5**). Dies traf im Übrigen auch für die entsprechenden Kreuz-Resistenzen gegenüber SAHA und VPA zu. Dies lässt darauf schließen, dass auch die TSA-induzierte Resistenz, respektive Kreuz-Resistenzen (bei den MLH1-defizienten Varianten) stabil sind.

Tabelle 5: IC₅₀-Werte der TSA-vorbehandelten Zelllinien und der nicht-vorbehandelten Zelllinien in Abhängigkeit der Beobachtungsperiode (knapp 4 Monate)

Zelllinie	IC₅₀ (nM)^a	IC₅₀ (nM)^b	IC₅₀ (nM)^c
HCT116+ch2	10.4	7.9	9.2
HCT116+ch2/TSA	17.7	13.8	16.3
Resistenz^d	1.70	1.75	1.77
HCT116+ch3	10.5	7.3	8.9
HCT116+ch3/TSA	9.6	7.3	8.6
Resistenz^d	0.91	1.00	0.97

IC₅₀-Werte und Resistenz ermittelt: (a) direkt nach abgeschlossener Vorbehandlung; (b) nach 9 Propagationen (6 Wochen); und nach 17 Propagationen (14 Wochen). (d) Resistenz definiert als Verhältnis der IC₅₀-Werte zwischen vorbehandelten und nicht-vorbehandelten Zellen.

5 Diskussion

5.1 Histondeazetylasen-Hemmer als potente Chemotherapeutika und potenzielle Verursacher von Resistenz

Den HDAC-Hemmern wird eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von verschiedenen Krebsarten zugeschrieben. Einige HDAC-Hemmer werden schon auf klinischer Basis untersucht, wobei sich herausgestellt hat, dass die therapeutische Konzentration, die zur Hemmung des Tumorwachstums nötig ist, wenig Nebenwirkungen verursacht und somit von Krebspatienten gut toleriert wird. Es scheint auch, dass die Nebenwirkungen von HDAC-Hemmer im Gegensatz zu denen anderer Chemotherapeutika weniger gravierend sind, da die HDAC-Hemmer nur in Tumorzellen (tumorzellen-spezifisch) und nicht in gesunden Zellen den Zelltod induzieren (Kelly et al., 2005; Ungerstedt et al., 2005). Man geht davon aus, dass die HDAC-Hemmer eine zentrale Rolle in der Tumorbekämpfung einnehmen werden. Sie können durch eine erhöhte Expression von Genen, welche spezifisch in Tumorzellen die Proliferation verhindern oder die Apoptose bewirken, die Effizienz von Chemo- und Radiotherapie erheblich steigern (Senguputa und Seto, 2004; Dokmanovic und Marks, 2005; Drummond et al., 2005).

Leider ist bei der Chemotherapie von Tumorerkrankungen die Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika eine häufig auftretende und gefürchtete Komplikation. Obwohl es noch keine Daten mit Patienten gibt, scheinen - zumindest aufgrund neuerer *in vitro* Studien - auch einige HDAC-Hemmer davon nicht verschont zu sein. In diesen Studien wurde eine Resistenzentwicklung durch den Depsipeptid-Typ HDAC-Hemmer FK228 beobachtet. Die Resistenz ist reversibel, und als Grund für die Reversibilität wurde die FK228-induzierte Induktion des MDR1 Multidrug-Resistance-Transporters identifiziert (Xiao et al., 2005; Yamada et al., 2005). MDR1 ist eine so genannte Effluxpumpe, welche Chemotherapeutika wie auch andere Toxine entweder aus der Zelle hinaustransportiert oder sie in intrazellulären Kompartimenten sammelt. Damit wird die effektive Chemotherapeutikumkonzentration und dementsprechend dessen Wirksamkeit in der Zelle reduziert.

Das Labor um Dr. Fedier beschäftigt sich auch mit der Problematik der möglichen Resistenzentwicklung durch HDAC-Hemmer. Vor kurzem konnten er und seine Mitarbeiter beobachten, dass ein mehrfaches (sequenzielles) Behandeln von Tumorzellen mit ansteigenden Dosen von SAHA zu einer Resistenz nicht nur

gegenüber SAHA sondern auch zu einer Kreuz-Resistenz gegenüber TSA und VPA führt. Diese (Kreuz-)Resistenz ist nicht-reversibel und ist MDR1-unabhängig, was auf einen neuen, von FK228 verschiedenen Resistenztyp schliessen lässt. In ihrer Studie verwendeten sie eine MLH1-profiziente und eine MLH1-defiziente Zelllinie und fanden, dass dieser Effekt bei beiden Zelllinien auftrat, also unabhängig davon war, ob die Zellen das MLH1-Protein exprimierten oder nicht. Es stellte sich natürlich die Frage, ob diese Art von Resistenzentwicklung nur für SAHA zu beobachten war oder ob diese auch für andere HDAC-Hemmer wie beispielsweise TSA, welches strukturell mit SAHA verwandt ist und deshalb chemisch derselben Substanzklasse der Hydroxamsäure angehört, zutrifft. Dies zu prüfen war Inhalt der vorliegenden Arbeit.

5.2 Histondeazetylasen-Hemmer-induzierte Resistenz: die möglichen Ursachen und die Rolle von MLH1

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass die Vorbehandlung mit TSA nur bei den Zellen, die kein funktionelles MLH1-Protein exprimieren, zu einer Resistenzentwicklung führt. Bei den Zellen, welche dieses Protein exprimieren, konnte keine Resistenzentwicklung beobachtet werden. Dies trifft auch für die Kreuz-Resistenz dieser TSA-resistenten, MLH1-defizienten Zellen gegenüber SAHA and VPA zu. Daraus lässt sich schliessen, dass neben SAHA auch TSA ein potenzieller Verursacher von Resistenz ist, dass dies aber (im Falle von TSA) nur bei Zellen mit fehlendem MLH1-Protein auftritt. Diese Beobachtung unterscheidet sich von derjenigen mit SAHA, wo die Resistenzentwicklung unabhängig vom Vorhandensein oder Fehlen von MLH1 war. Im Falle von TSA scheint die Expression des MLH1-Proteins eine Resistenzentwicklung durch TSA zu verhindern, was auf einen möglichen Zusammenhang zwischen HDACs und MLH1, beziehungsweise dem MMR-System, hinweisen könnte. Ein solcher Zusammenhang wird durch Daten einer anderen Arbeitsgruppe unterstützt, welche zeigten, dass die durch Hypoxie induzierte verminderte Expression des MLH1-Gens in Tumorzellen durch TSA verhindert werden konnte (Mihaylova et al., 2003). Die molekularen Mechanismen bleiben aber weiter unklar, und es bleibt die Frage, warum dies nur bei TSA nicht aber auch bei SAHA, welches chemisch zur selben Substanzklasse wie TSA gezählt wird, zu beobachten war.

Nicht nur die mögliche Rolle von MLH1, sondern auch die allgemeine molekulare Basis, welche der mit SAHA und TSA beobachteten Resistenzentwicklung zugrunde liegt, ist

unklar. Die Resistenz gegenüber SAHA und TSA könnte auch aufgrund verminderter Interaktion zwischen HDAC-Hemmer und Zielmolekül (HDACs), erhöhter intrazellulärer Detoxifizierung der HDAC-Hemmer durch nicht-MDR-Systeme oder noch unbekannter zellulärer Signalkaskaden entstehen. Möglicherweise haben unsere Befunde vielerlei Ursachen, beispielsweise die veränderte Expression einer Vielzahl von Schlüsselgenen, welche die Zellproliferation und Apoptose regulieren. Es könnte auch sein, dass die Resistenzentwicklung eine nicht-HDAC-bedingte Ursache hat.

5.3 Resistenz durch FK228 versus SAHA und TSA: ein Vergleich

Offenbar gibt es Unterschiede zwischen dieser Arbeit mit TSA und denjenigen mit FK228 (Yamada et al., 2006; Xiao et al., 2005). Das Ausmass der TSA-induzierten Resistenz ist etwa 2-fach. Es ist damit etwa gleich gross wie dasjenige, welches für SAHA in diesem Zusammenhang beobachtet wurde. Diese etwa 2-fache Resistenz ist verglichen mit derjenigen, welche bei der früheren Studie (Xiao et al., 2005) mit FK228 beobachtet wurde (bis zu 10'000-fach) eher klein. In dieser früheren Studie korrelierte die FK228-induzierte Resistenz mit einer Expression der MDR1 Multidrug Resistance-Pumpe. Hingegen zeigte sich, dass die Resistenzentwicklung mit SAHA MDR1-unabhängig war. Ob dies auch für den hier beschriebenen Fall für TSA zutrifft, wird weiter untersucht, und erste Hinweise deuten darauf hin, dass sowohl die SAHA-induzierte Resistenz wie auch die hier beschriebene TSA-induzierte Resistenz nicht mit der MDR1-Expression einhergehen. Somit könnte der hier beobachteten Resistenzentwicklung ein neuer, möglicherweise noch unbekannter Mechanismus zugrunde liegen.

Ein weiterer möglicher Unterschied zwischen dieser Arbeit und der früheren Studie mit FK228 (Xiao et al., 2005) könnte die Stabilität der induzierten Resistenz betreffen. In der Studie von Xiao und seinen Mitarbeitern war die Resistenz reversibel und zwar bedingt durch die (reversible) Induktion der MDR1-Pumpe durch FK228 selbst. Die Resultate mit SAHA haben gezeigt, dass diese SAHA-induzierte Resistenz irreversibel ist, d.h., dass die induzierten, resistenten Zellen diese Resistenz auch in Abwesenheit des Selektionsmediums (=SAHA) beibehalten. Zurzeit wird im Labor abgeklärt, ob dies auch für TSA gilt, und die ersten Hinweise gehen eindeutig in diese Richtung.

5.4 Bedeutung der Resultate und Ausblick

Aus den Resultaten dieser Arbeit lässt sich sagen, dass TSA ein möglicher Verursacher von Resistenz ist, und dass im Falle von TSA die Resistenzentwicklung mit dem Fehlen des MLH1-Proteins korreliert. Diese Resultate erweitern diejenigen früherer Studien, und sie könnten Teil eines allgemeineren Prinzips sein, nach welchem HDAC-Hemmer nicht nur nachweislich tumorizide Wirkung haben, sondern auch Ursache für Resistenzentwicklung sein können.

Mit Blick in die Zukunft ist ebenfalls klar, dass diese hier beschriebenen *in vitro* Befunde sich in Tiermodellen und dann später in klinischen Studien bei Patientinnen und Patienten reproduziert werden müssen, um ihre Relevanz allenfalls zu bestätigen. Oder um es anders auszudrücken: ist diese moderate, hier *in vitro* beobachtete Resistenz ausreichend, um eine Chemotherapie basierend auf HDAC-Hemmern negativ zu beeinträchtigen? Weiter sollte untersucht werden, ob unsere Befunde gewebespezifisch sind, ob sie nur zelllinien-spezifisch sind, und ob sich diese HDAC-Hemmer-induzierte Resistenz auch auf die therapeutische Wirksamkeit von einigen anderen (nicht-HDAC-Hemmer-Typ) Substanzen wie beispielsweise Cisplatin, Doxorubicin (=Adriamycin), Docetaxel und anderen auswirkt.

Um Antworten auf diese Fragen zu erhalten, müssen weitere Studien durchgeführt werden. Sicher bleibt hier die Frage nach einer möglichen klinischen Relevanz dieser Erkenntnis.

6 Literaturverzeichnis

1. Aebi S, Fink D, Gordon R, Kim HK, Zheng H, Fink L, Howell SB. Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* 1997;3:1763-7
2. Ahringer J. NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet* 2000;16:351-6
3. Allfrey VG, Faulkner R, Milsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964;51:786-94
4. Bellacosa A. Functional interactions and signalling properties of mammalian DNA mismatch repair proteins. *Cell Death Diff* 2001;8:1076-92
5. Blaheta RA, Michaelis M, Driever PH, Cinatl J Jr. Evolving anticancer drug valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies. *Med Res Rev* 2005;25:383-97
6. Boyer JC, Umar A, Risinger Ji, Lipford JR, Kane M, Yin S, Barrett JC, Kolodner RD, Kunkel TA. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1995;55:6063-70
7. Braunstein M, Rose AB, Allis CD, Broach JR. Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev* 1993;7:592-604
8. Brown R, Hirst GL, Gallagher WM, McIlwrath AJ, Margison GP, van der Zee AG, Anthoney DA. hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene* 1997;15:45-52
9. Butler LM, Zhou X, Xu W-S, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and downregulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:11700-5
10. Cress WD and Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* 2000;184:1-16
11. D'Atri S, Tentori L, Lacal PM, Graziani G, Pagani E, Benincasa E, Zambruno G, Bonmassar E, Jiricny J. Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. *Mol Pharmacol* 1998;54:334-41
12. De Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg ABP. Histone deacetylase (HCADs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003;370:737-49
13. Dokmanovic M and Marks PA. Prospects: Histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem* 2005;96:293-304

14. Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:495-528
15. Duval A and Hamelin R. Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers. *Annales de Génétique* 2002;45:71-5
16. Eshleman JR, Markowitz SD, Donover PS, Lang EZ, Lutterbaugh JD, Li GM, Longley M, Modrich P, Veigl ML, Sedwick WD. Diverse hypermutability of multiple expressed sequence motifs present in a cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 1996;12:1425-32
17. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R. Detection of aberrant promotor hypermethylation of tumour suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999;59:67-70
18. Fedier A and Fink D. Mutations in DNA mismatch repair genes: implications for DNA damage signaling and drug sensitivity. *Int J Oncol* 2004 24:1039-47
19. Fedier A, Fowst C, Tursi J, Geroni C, Haller U, Marchini S, Fink D. Brostallicin (PNU-166196) - a new DNA minor groove binder that retains sensitivity in DNA mismatch repair-deficient tumour cells. *Br J Cancer* 2003;89:1559-65
20. Fedier A, Schwarz VA, Walt H, Carpini RD, Haller U, Fink D. Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *Int J Cancer* 2001;93:571-6
21. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehmé A, Christen RD, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 1996;56:4881-6
22. Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 1999;401:188-93
23. Fischle W, Dequiedt F, Fillion M, Hendzel MJ, Voelter W, Verdin E. Human HDAC7 histone deacetylase activity is associated with HDAC3 in vivo. *J Biol Chem* 2001;276:35826-35
24. Fischle W, Dequiedt F, Hendzel MJ, Guenther MG, Lazar MA, Voelter W, Verdin E. Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol Cell* 2002;9:45-57
25. Fishel R and Kolodner RD. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:382-95
26. Friedman HS, Johnson SP, Dong Q, Schold SC, Rasheed BK, Bigner SH, Ali-Osman F, Dolan E, Colvin OM, Houghton P, Germain G, Drummond JT, Keir S, Marcelli S, Bigner

- DD, Modrich P. Methylator resistance mediated by mismatch repair deficiency in a glioblastoma multiforme xenograft. *Cancer Res* 1997;57:2933-6
27. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:793-8
 28. Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common genes et produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2003;2:151-63
 29. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001;20:6969-78
 30. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997;389:349-52
 31. Guenther MG, Barak O, Lazar MA. The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol* 2001;21:6091-101
 32. Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Klein PS. Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res* 2004;64:1079-86
 33. Hamburger AW, Sydney ES. Primary Bioassay of Human Tumor Stem Cells. *Science* 1977;197:461-3
 34. Hawn MT, Umar A, Carethers JM, Marra G, Kunkel TA, Boland CR, Koi M. Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res* 1995;55:3721-5
 35. Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* 1988;7:1395-402
 36. Heinzel T, Lavinsky RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, Yang WM, Brard G, Ngo SD, Davie JR, Seto E, Eisenmann RN, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG. A complex containing N-CoR, mSin3, and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 1997;387:43-8
 37. Henderson C, Mizzau M, Paroni G, Maestro R, Schneider C, Brancolini C. Role of caspases, Bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *J Biol Chem* 2003;278:12579-89
 38. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Wilson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB.

- Incidence and functional consequences of hMLH1 promotor hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6870-5
39. Herold C, Ganslmayer M, Ocker M, Hermann M, Geerts A, Hahn EG, Schuppan D. The histone-deacetylase inhibitor Trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells. *J Hepatol* 2002;36:233-40
 40. Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 2000;403:795-800
 41. Jang ER, Lim SJ, Lee ES, Jeong G, Kim TY, Bang YJ, Lee JS. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A sensitizes estrogen receptor α -negative breast cancer cells to tamoxifen. *Oncogene* 2004;23:1724-36
 42. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074-80
 43. Jiricny J and Nyström-Lahti M. Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:157-61
 44. Jiricny J: Replication errors: cha(lle)nging the genome. *EMBO J* 1998;17:6427-36
 45. Jones PA and Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21:163-7
 46. Jones PL. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress ranscription. *Nat Genet* 1998;19:187-91
 47. Kao HY, Verdel A, Tsai CC, Simon C, Juguilon H, Khochbin S. Mechanism for nucleocytoplasmic shuttling of histone deacetylase 7. *J Biol Chem* 2001;276:47496-507
 48. Kelly WK, O'Connor OA, Krug LM, Chiao JH, Heaney M, Curley T, MacGregore-Cortelli B, Tong W, Secrist JP, Schwartz L, Richardson S, Chu E, Olgac S, Marks PA, Scher H, Richon VM. Phase I Study of an Oral Histone Deacetylase Inhibitor, Suberoylanilic Hydroxamic Acid, in Patients With Advanced Cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:3923-31
 49. Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW, Kim KW. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med* 2001;7:437-43
 50. Koi M, Umar A, Chauhan DP, Cherian SP, Carethers JM, Kunkel TA, Boland CR. Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res* 1994;54:4308-4312
 51. Kolodner RD and Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:89-96
 52. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther* 2000;85:217-29

53. Lengauer C and Issa JP. The role of epigenetic in cancer: DNA methylation, imprinting, and the epigenetics of cancer. *Mol Med Today* 1998;4:102-3
54. Li G-M. The role of mismatch repair in DNA damage-induced apoptosis. *Oncol Res* 1999;11:393-400
55. Li HJ. A model for chromatin structure. *Nucl Acids Res* 1975;8:1275-89
56. Liu LT, Chang HC, Chiang LC, Hung WC. Histone deacetylase inhibitor upregulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. *Cancer Res.* 2003;63:3069-72
57. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature* 1997;389:251-60
58. Mackay HJ, Cameron D, Rahilly M, Mackean MJ, Paul J, Kaye SB, Brown R. Reduced MLH1 expression in breast tumors after primary chemotherapy predicts disease-free survival. *J Clin Oncol* 2000;18:87-93
59. Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R. Histone Deacetylation in Epigenetics: An Attractive Target for Anticancer Therapy. *Med Res Rev* 2005;25:261-309
60. Marra G and Schaer P. Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem J* 1999;338:1-13
61. Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, Suhan T, Cinatl J, Blaheta RA, Hofmann K, Kotchetkov, R, busse R, Nau H, Cinatl J. Valproic acid inhibits angiogenesis un vitro and in vivo. *Mol Pharmacol* 2004;65:520-7
62. Mihaylova V, Bindra RS, Yuan J, Campisi D, Narayanan L, Jensen R, Giordano F, Johnson RS, Rockwell S, Glazer PM. Decreased Expression of the DNA Mismatch Repair Gene Mlh1 under Hypoxic Stress in Mammalian Cells. *Mol Cell Biol* 2003;23:3265-73
63. Modrich P and Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 1996;65:101-33
64. Murata H, Khattar NH, Gu L, Li G-M. Roles of mismatch repair proteins hMSH2 and hMLH1 in the development of sporadic breast cancer. *Cancer Lett* 2005;223:143-50
65. Nan X. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998;393:386-9
66. Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:1174-9
67. Pogo BGT, Allfrey VG, Mirsky AE. RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1966;55:805-12

68. Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:3003-7
69. Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10014-9
70. Roberti A, Sala DL, Cinti C. Multiple genetic and epigenetic interacting mechanisms contribute to clonally selection of drug-resistant tumors: Current views and new therapeutic prospective. *J Cell Physiol* 2006;207:571-81
71. Rosato RR and Grant S. Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs* 2004;13:21-38
72. Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2001;70:81-120
73. Samimi G, Fink D, Varki NS, Husain A, Hoskins WJ, Alberts DS, Howell SB. Analysis of MLH1 and MSH2 expression in ovarian cancer before and after platinum drug-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2000;6:1415-21
74. Senguputa N, Seto E. Regulation of Histone Deacetylase Activities. *J Cell Biochem* 2004;93:57-67
75. Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:18030-5
76. Strahl BD and Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;403:41-45
77. Strait KA, Dabbas B, Hammond EH, Warnick CT, Istrup SJ, Ford CD. Cell cycle blockade and differentiation of ovarian cancer cells by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A are associated with changes in p21, Rb, and Id proteins. *Mol Cancer Ther* 2002;1:1181-90
78. Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu Y-Z, Zheng Q, Edwards M, Mace R. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* 1996;273:1109-11
79. Takai N, Desmond JC, Kumagai T, Gui D, Said JW, Whittaker S, Miyakawa I, Koeffler HP. Histone deacetylase inhibitors have profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:1141-9
80. Tang R, Faussat A-M, Majdak P, Perrot J-Y, Chaoui D, Legrand O, Marie J-P. Valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells expressing P-gp and MRP1. *Leukemia* 2004;18:1246-51

81. Teicher BA, ed. Cancer drug resistance. Humana Press 2006;Totowa, NJ
82. Thelen P, Schweyer S, Hemmerlein B, Wuttke W, Seseke F, Ringert RH. Expressional changes after histone deacetylase inhibition by valproic acid in LNCaP human prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2004;24:25-31
83. Turner BM. Cellular memory and the histone code. *Cell* 2002;111:285-91
84. Turner BM. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 2000;22:836-45
85. Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu WS, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G, Ngo L, Holmgren A, Jiang X, Marks PA. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:673-8
86. Verma M and Srivastava S. Epigenetics in cancer: Implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol* 2002;3:755-63
87. Xiao JJ, Huang Y, Dai Z, Sadee W, Chen J, Liu S, Marcucci G, Byrd J, Covey JM, Wright J, Grever M, Chan KK. Chemoresistance to depsipeptide FK228 [(E)-(1S,4S,10S,21R)-7-[(Z)-ethylidene]-4,21-diisopropyl-2-oxa-12,13-dithia-5,8,20,23-tetraazabicyclo[8,7,6]-tricos-16-ene-3,6,9,22-pentanone] is mediated by reversible MDR1 induction in human cancer cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:467-75
88. Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:140-7
89. Xu W, Perez G, Ngo L, Gui C, Marks PA. Induction of Polyploidy by Histone Deacetylase Inhibitor: A Pathway for Antitumor Effects. *Cancer Res* 2005;65:7832-9
90. Yamada H, Arakawa Y, Saito S, Agawa M, Kano Y, Horiguchi-Yamada J. Depsipeptide-resistant KU812 cells show reversible P-glycoprotein expression, hyper-acetylated histones, and modulated gene expression profile. *Leuk Res* 2006;30:723-734
91. Yoshida M and Beppu T. Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both the G1 and G2 phases by Trichostatin A. *Exp Cell Res* 1988;177:122-31
92. Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 1990;265:17174-9
93. Zhang H, Richards B, Wilson T, Lloyd M, Cranston A, Thorburn A, Fishel R, Meuth M. Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMLH1. *Cancer Res* 1999;59:3021-7

7 Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Dr. André Fedier für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die engagierte und sehr menschliche Betreuung und sowie für die exzellente fachliche Unterstützung. Ich bin ihm sehr zu Dank verpflichtet für die Zeit, die er sich genommen hat für Besprechungen sowie auch für die Korrektur meiner Arbeit.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Forschungsabteilung Gynäkologie am Universitätsspital Zürich für das freundschaftliche Arbeitsklima und für die Ratschläge im Labor.

Herrn Prof. Dr. Daniel Fink danke ich herzlich für die Unterstützung dieses Projekts.

Meinen Eltern bin ich sehr dankbar für die Finanzierung meiner Ausbildung.

An dieser Stelle möchte ich Emanuel Steinhauer meinen besonderen Dank aussprechen für die vielfältige Unterstützung und für das geduldige Korrekturlesen meiner Arbeit.

8 Curriculum Vitae

Michèle Akane Furlato von Italien

16.04.1984	Geboren in Bülach (ZH)
1991-1996	Primarschule in Embrach (ZH)
1996-2002	Kantonsschule Zürcher Unterland, Bülach (ZH) Altsprachliches Profil (Matura mit Schwerpunktfach Englisch)
2002-2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Zürich
10/2008	Staatsexamen an der Universität Zürich
ab 12/2008	Assistenzärztin Chirurgie Spital Wil (SG)